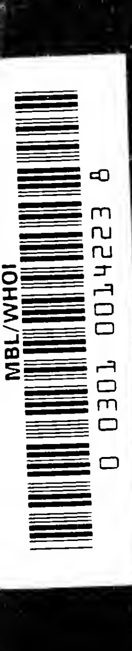
Otto Tunmann

Pflanzenmikrochemie







Pflanzenmikrochemie



Pflanzenmikrochemie

Ein Hilfsbuch

beim

mikrochemischen Studium pflanzlicher Objekte



von

Dr. O. Tunmann

Privatdozent an der Universität Bern

Mit 137 Abbildungen im Text

Berlin

Verlag von Gebrüder Borntraeger

W 35 Schöneberger Ufer 12 a

1913

Druck von E. Buchbinder (H. Duske) in Neuruppin.

Vorwort

Das Studium mikroskopisch-chemischer Reaktionen, die Mikrochemie, lag bis vor wenigen Jahrzehnten ausschließlich in den Händen der Botaniker. Die Anfänge der Mikrochemie setzten mit dem Beginn der anatomischen Forschung ein; man verfolgte die Einwirkung verschiedener Reagentien auf die Zellen und ihre Inhalte und auf die Gewebe. Erst seit Mitte des vorigen Jahrhunderts wurden auch in anderen Wissenschaften, besonders in der Mineralogie und in der Chemie, mit Hilfe des Mikroskopes chemische Reaktionen ausgeführt, bei denen der Schwerpunkt auf die Entstehung charakteristischer kristallinischer Niederschläge gelegt wurde. Auf diese Weise erhielt der Begriff Mikrochemie etwas Unbestimmtes und wird jetzt von verschiedener Seite in verschiedenem Sinne gebraucht. Um Mißverständnisse auszuschließen, muß man das Gebiet, daß sich nur mit pflanzlichen Objekten beschäftigt, bestimmter benennen und als „botanische Mikrochemie", „Phytomikrochemie" oder als „Pflanzenmikrochemie" bezeichnen. Wir wählen die Bezeichnung Pflanzenmikrochemie (Nat. Vers. Karlsruhe 1911), da sich seit langem die Ausdrücke Pflanzenanatomie, Pflanzenphysiologie u. a. eingebürgert haben und weil sich eine Trennung des großen Gebietes in eine reine und in eine angewandte Pflanzenmikrochemie anbahnt. Das vornehmste Ziel der reinen Pflanzenmikrochemie liegt in dem Nachweis der Körper in der Zelle selbst und im Gewebe sowie in der eingehenden Charakteristik der Zellwände und der organisierten Bestandteile der Zelle. Hauptaufgabe der angewandten Pflanzenmikrochemie ist der tunlichst unmittelbar mit den pflanzlichen Objekten am Objektträger ausgeführte Nachweis der Pflanzenstoffe bei möglichst geringem Aufwand an Zeit und Material. In der reinen Mikrochemie erfolgt ebenfalls eine Spezialisierung, sehen wir doch in unsern Tagen die Entwicklung der quantitativen Mikrochemie (Emich, Donau u. a.), die bereits schöne Erfolge aufweisen kann (eine Chlorbestimmung ist in einer halben Stunde durchführbar) und zu einer vollständigen Mikroelementaranalyse führen wird. Alle Arbeiten der reinen Mikrochemie, sowohl der quanti-

tativen, als auch und besonders der von Behrens und seinen Schülern ausgebauten qualitativen, fördern mehr oder weniger die Pflanzenmikrochemie.

Die Pflanzenmikrochemie steht erst im Anfange ihrer Entwicklung. Überall sind große Lücken vorhanden. Ihr weiterer Ausbau wird und muß erfolgen, nicht etwa, weil gegenwärtig hier und da Neigung zu mikrochemischen Studien besteht, sondern aus zwingenden Gründen, die uns die zunehmende Bedeutung der Pflanzenmikrochemie, besonders der angewandten, erkennen lassen. Nur wenige Hinweise mögen zur Begründung dienen: — Von großer Wichtigkeit sind mikrochemische Arbeiten auf dem Gebiete der systematischen Anatomie, worauf schon vor Jahren von Solereder hingewiesen wurde. Wenn hier die Erfolge der Mikrochemie nicht augenfällig zutage treten, so liegt dies daran, daß eine Zusammenstellung der ermittelten Befunde fehlt, und daß die Anatomen bisher mikrochemische Fragen meist unbeachtet ließen, wahrscheinlich weil die erforderlichen Methoden nicht übersichtlich zur Hand waren. Wo man näher auf die Mikrochemie eingegangen ist, sind in der Mehrzahl der Fälle die Erfolge nicht ausgeblieben. Mannit, Dulcit, Enzymzellen u. a. sind zur Gruppeneinteilung benutzt worden. Zuweilen stellen sich überraschende Resultate heraus. Wurzeln und Rhizome von Gelsemium sempervirens lassen sich mikrochemisch in einer Minute von den ähnlich gebauten Organen von G. elegans unterscheiden. Von den reichen Schätzen, welche die Herbarien der Kulturländer bergen, ist nur ein verschwindend kleiner Bruchteil mikrochemisch untersucht. Wäre auch nur ein Teil der Zeit und Mühe, die die Erforschung des anatomischen Baues beanspruchte, auf die Mikrochemie gefallen, dann wären wir heute über viele Fragen besser unterrichtet, so beispielsweise über die Frage, ob systematisch nahe stehende Pflanzen in ihren chemischen Produkten übereinstimmen und ob die als „Ausnahmen" bekannten Pflanzen nicht doch einen entwicklungsgeschichtlichen Zusammenhang zeigen. Wohl fehlen vielfach makrochemische Angaben. Doch gerade dann kommt der Mikrochemie ein hoher orientierender Wert zu: sie fordert den Chemiker zur Nach- und Weiterprüfung heraus. Bei nicht wenigen Pflanzen müssen wir schon deshalb zur Mikrochemie greifen, weil sie in größerer, zu einer makrochemischen Untersuchung ausreichenden Menge nicht oder doch nur sehr schwer zu beschaffen sind. Der Ausbau der systematischen Anatomie ist vollendet, eine Ergänzung durch mikrochemische Studien ist erforderlich. Hierbei kommt es hauptsächlich auf den Nachweis bestimmter Körper an (die Lokalisationsvermittelung steht erst an zweiter Stelle) und zu derartigen Prüfungen lassen sich fast stets Herbarpflanzen benutzen. — Bei der Untersuchung der Drogenpulver hat

sich wiederholt gezeigt, daß eine genaue Bestimmung verschiedener Pulver auf rein anatomischem Wege nicht nur unvollständig, sondern geradezu unmöglich ist. Hierzu kommt, daß nur mikrochemische Reaktionen uns darüber aufklären, ob einem Pulver die wirksamen Bestandteile entzogen sind, und daß in neuerer Zeit vielfach Pulver in den Handel kommen, bei denen die diagnostisch brauchbaren Charaktere durch eine zu weitgehende Zerkleinerung derart zerstört sind, daß die anatomische Untersuchung unmöglich wird. Auch bei unzerkleinerten Drogen führen mikrochemische Reaktionen oft weit schneller, doch ebenso sicher zum Ziele wie makrochemische Untersuchungen. Überdies liegen in den weitaus meisten Fällen die wirksamen Bestandteile in den Zellinhalten und schon aus diesem Grunde sollte das mikrochemische Studium mehr wie bisher Berücksichtigung finden. — Seit langem zieht man die Mikrochemie bei der Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel mit Erfolg heran und auf dem Gebiete der Prüfung von Papieren und Pflanzenfasern kann man ohne sie nicht auskommen. — Eine eingehende mikrochemische Vorprüfung der zu untersuchenden Objekte wird für den Chemiker ebenfalls nur von Vorteil sein; sie wird den zu wählenden Untersuchungsgang bestimmen und während der Untersuchung Aufklärung geben, ob die benutzte Methode zuverlässig ist, ob nicht etwa bei Membranstudien Zellinhalte mit verarbeitet worden sind u. a. Nur zu oft greift der Chemiker erst sehr spät zum Mikroskop, nicht selten nur, um „Kristalle“ zu suchen. — Selbst auf dem schwierigen Gebiet der Harze, deren Erforschung wir Tschirch verdanken, sind die Anfänge gelegt: man kann einige der häufig auftretenden Harzkörper auf einfache Weise mikrochemisch nachweisen. — Nicht zu entbehren ist schließlich die Mikrochemie überall dort, wo nur geringe Mengen zur Verfügung stehen, oder das Material aus irgend einem Grunde geschont werden muß. Wie viele Harze werden nicht untersucht, weil sie nur in kleineren Mengen oder nur in Sammlungsstücken zur Verfügung stehen? Bei seltenen Objekten (Mumienharzen) ist in Zukunft eine aufklärende Voruntersuchung auf mikrochemischem Wege dringend geboten, damit nicht die makrochemische Untersuchung wertvolle, schwer zu beschaffende Objekte restlos verarbeitet und eine Nachprüfung ausschließt. — Auf die Bedeutung der reinen Pflanzenmikrochemie braucht nicht eingegangen zu werden, denn es ist allgemein bekannt, daß sich unser Wissen über die Zelle zum großen Teile auf mikrochemische Studien aufbaut.

Wir sehen, die Pflanzenmikrochemie ist nicht nur für den Botaniker, Pharmakognosten, Apotheker, Nahrungsmittel- u. Phytochemiker, sondern für alle, die sich mit der Untersuchung pflanzlicher Objekte beschäftigen, unentbehrlich. Man sollte meinen, daß dieses Gebiet eine Bearbeitung

von verschiedener Seite erfahren haben müßte; dem ist aber nicht so. Wir besitzen nur eine, das gesamte Gebiet umfassende Darstellung aus dem Jahre 1892 in der trefflichen „Botanischen Mikrotechnik" von A. Zimmermann. Seither ist der Ausbau der Pflanzenmikrochemie gewaltig vorwärts geschritten und der Mangel eines neueren Hilfsbuches wurde, da die einschlägigen Arbeiten in den verschiedensten Zeitschriften erscheinen, immer fühlbarer. Diese Lücke hofft vorliegendes Buch auszufüllen.

Bei der Abfassung des Buches waren folgende Gesichtspunkte maßgebend: Die Grenze zwischen Pflanzenmikrochemie und reiner Mikrochemie kann nicht scharf gezogen werden, gegenwärtig, da die letztere sich noch vorwiegend mit anorganischen Körpern beschäftigt, vielleicht noch leichter als in Zukunft. Im allgemeinen kann man aber sagen, daß alle Arbeiten, die sich direkt mit den pflanzlichen Objekten und zwar in einfacher Weise am Objektträger ausführen lassen, in unser Gebiet fallen. Daraus geht hervor, daß Arbeiten, die von schwieriger herzustellenden Zubereitungen (Auszügen, gereinigten Lösungen) ausgehen, uns schon ferner liegen. Doch, es sei nochmals betont, diese Abgrenzung ist nicht scharf. Neigungen und Fähigkeiten des Einzelnen werden die Grenze bald nach der chemischen, bald nach der physikalischen, speziell kristallographischen Seite verschieben. Die Untersuchungsmethoden sind tunlichst vollständig gebracht. Auch ältere Verfahren sind angeführt, nicht nur dort, wo keine besseren zur Verfügung stehen, sondern zuweilen auch neben den modernen. Hierfür war die Erfahrung maßgebend, daß nicht selten in den sog. „veralteten" Verfahren ein guter Kern steckt, und daß zuweilen kleinere Abänderungen zur Verbesserung genügen. Schließlich ist nicht immer das Neue auch zugleich das Bessere. Zimmermanns Mikrotechnik beschränkt sich auf die Methoden. Darin liegt eine Unvollständigkeit. Bei allen Untersuchungen, die zur Ermittelung der Lokalisation unternommen werden, müssen die Ergebnisse mitgeteilt werden. Diese Notwendigkeit zeigt sich besonders bei den Alkaloiden und Glykosiden, die eine zusammenfassende Darstellung bisher von keiner Seite erfahren haben. Unstimmigkeiten in den Befunden sind hervorgehoben und zur Diskussion gestellt, um eine Nachprüfung anzuregen. Auch die in Kleindruck gestellten Angaben über das Vorkommen und die Verbreitung der Pflanzenstoffe, über die quantitativen Ergebnisse der chemischen Forschung und die zahlreichen Hinweise auf die physiologische Bedeutung der Körper stehen in einem innigen Zusammenhang mit der Mikrochemie. Sie zeigen uns die brauchbarsten Versuchsobjekte, geben uns an, in welchen Pflanzenteilen und zu welcher Jahreszeit wir die besten Resultate erwarten können, und bewahren

den Anfänger vor Enttäuschungen, die gar zu oft vor einem weiteren Einarbeiten abschrecken. Für die Aufnahme der physiologischen Hinweise war die Tatsache ausschlaggebend, daß die Pflanzenmikrochemie ein wichtiges Hilfsmittel bei der Erforschung der physiologischen Verhältnisse ist. Vielfach werden mikrochemische Arbeiten zur Klärung physiologischer Fragen unternommen. Das in dieser Hinsicht Mitgeteilte, das die neuere Literatur berücksichtigt, dürfte zur ersten Orientierung genügen. Bei weiteren Studien wird man natürlich zur chemischen und physiologischen Spezialliteratur greifen. Eine ausführliche Bearbeitung hat die Zelle gefunden. Ist doch die genaue Kenntnis der organisierten Zellbestandteile selbst für die angewandte Pflanzenmikrochemie Grundbedingung: anderenfalls können jederzeit Irrtümer unterlaufen, so können, um nur ein Beispiel anzuführen, Zellkerne für Oxalate gedeutet werden und Alkaloidniederschläge vortäuschen. Dieser Abschnitt dürfte jedenfalls allen denen willkommen sein, die sich noch nicht eingehender mit der lebenden Zelle beschäftigt haben.

Aus Vorstehendem geht hervor, daß bei der Abhandlung des Gebietes die Grenzen nach jeder Richtung hin weit gesteckt wurden. Auch die Färbungen wurden aufgenommen, da sie zur Diagnose dienen, in bestimmten Fällen übrigens auf chemischen Prozessen beruhen dürften. Das Buch hat dadurch etwas an Umfang zugenommen, wird aber auch eine ausgedehntere Anwendung gestatten, zumal die mikrotechnische Seite eingehende Berücksichtigung fand.

Die Nachprüfungen, die bei der Sichtung der umfangreichen Literatur ausgeführt wurden, erstrecken sich über mehrere Jahre. An vielen Stellen finden sich neue bisher noch nicht veröffentlichte Befunde, die der orientierte Leser auch dort herausfinden wird, wo sie nicht besonders gekennzeichnet sind. Eine größere Anzahl Untersuchungen konnte allerdings nicht in der beabsichtigten Weise weiter fortgeführt werden, da die Beschaffung der erforderlichen Kontroll- und Vergleichspräparate an die Mittel eines Einzelnen zu große Anforderungen stellt. Das benutzte Pflanzenmaterial stammt aus dem Botanischen Garten in Bern. Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle hierfür und für die Benutzung der Bibliothek des Botanischen Institutes Herrn Professor Dr. Ed. Fischer meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Bern, Anfang Dezember 1912

O. Tunmann





Inhaltsübersicht

A. Allgemeiner Teil.

Das Untersuchungsmaterial.

Zu mikrochemischen Studien läßt sich nicht nur lebendes und in geeigneter Weise lebend fixiertes und gehärtetes Material, sondern in vielen Fällen auch konserviertes (Alkohol, Formaldehyd), sowie getrocknetes (Drogen- und Herbarmaterial) verwenden. Überall dort, wo es sich um den Nachweis von Körpern handelt, die im Zellsaft gelöst sind (und das sind die meisten mit Ausnahme der organisierten Zellbestandteile), ist lebendes Material vorzuziehen, sehr oft unbedingt notwendig. Im allgemeinen wird der Mikrochemiker in seinen Objekten und Präparaten auf größere Mengen an reagierenden Substanzen rechnen können, als es nach den quantitativen Befunden der Chemie den Anschein hat, denn die chemische Isolierung der meisten Körper ist mit großen Verlusten verbunden. Hier ist ein Vorteil gegeben, der jedoch durch verschiedene Umstände sehr eingeschränkt wird.

Selbst **lebendes Material** verlangt Beachtung verschiedener Faktoren. Es ist wohl selbstverständlich, daß das Vegetationsstadium der Pflanzen und das Alter der untersuchten Organe zu berücksichtigen ist und daß die Literaturangaben, falls nicht ausdrücklich etwas anderes vermerkt ist, sich nur auf gesunde Pflanzen und Pflanzenteile beziehen. Glykoside sind in ausdauernden Gewächsen vor dem Austreiben der Knospen in größeren Mengen gespeichert, während der Vegetation erfolgt zuweilen eine Zunahme (Syringin), in anderen Fällen nicht (Hesperidin). Sie können in lebenden Pflanzen durch Pilze zersetzt werden (Convallaria majalis) und in etiolierten Blättern geschwunden sein (Blausäureglykosid in Prunus laurocerasus). Die Tageszeit der Einsammlung kann ebenfalls die Untersuchung beeinflussen. In der Nacht findet bei den von Weevers untersuchten Glykosiden eine Abwanderung des glykosidischen Zuckers statt, am frühen Morgen trifft man in den Blättern nur den zuckerfreien Spaltling an. Da wir nur

letzteren nachweisen, so wird die Abwanderung im allgemeinen nicht störend sein, falls nicht, was ebenfalls eintritt, eine Spaltung des Aglykons erfolgt. Außerdem weisen viele Pflanzen eine weitgehende Individualität im Gehalt an Glykosiden (s. d.) und Alkaloiden (s. d.) auf. Die Individualität wird sich jedenfalls auch bei anderen Körpern herausstellen; sie kann zu abweichenden Ergebnissen führen (s. Alkaloide). All diese Verhältnisse treten bei makrochemischen Arbeiten, bei denen bei der Verarbeitung vieler Pflanzen Durchschnittswerte erzielt werden, weniger in Erscheinung, sind bei der mikrochemischen Untersuchung jedoch von großem Einfluß. Hier hat die Mikrochemie noch ein weites unbebautes Feld. Häufig stellt man Pflanzen, um sie frisch zu halten, in Wasser. Bei längerem Stehen in Wasser können die Objekte weitgehende Veränderungen im Chemismus erleiden. Reservestoffe (Zucker, Stärke, Glykoside u. a.) können aufgebraucht werden; andere Körper (Colchicin) erfahren Zersetzungen und sind dann nicht mehr nachweisbar. Anormale Bodenverhältnisse und abnorme Witterung werden sich ebenfalls bei dem Untersuchungsmaterial bemerkbar machen.

Lebend **fixiertes** und **gehärtetes** Material ist bei Zellkernstudien unentbehrlich, ebenso bei leicht löslichen Schleimen, Gallerten und gummösen Flüssigkeiten; es wird auch zur Untersuchung von Plasma und Chromoplasten benutzt. Die Art der Fixierung richtet sich nach der beabsichtigten Untersuchung. Zur Härtung dient in erster Linie Alkohol, bei Schleimen Bleiazetat und Kupferazetat (s. Schleim). Vorzugsweise wird fixiertes Material zu Färbungen genommen. Die Fixierung soll möglichst die Strukturverhältnisse des lebenden Zustandes erhalten. Vielfach entstehen hierbei Kunstprodukte, so daß ein Vergleich mit lebendem Material unerläßlich ist. Näheres über Fixierung und Härtung s. unter Zellkern.

Konserviertes Material: Die Art der Konservierung muß sich ebenfalls nach der vorzunehmenden Untersuchung richten. Zum Konservieren dient gewöhnlich Alkohol, weniger Formaldehyd, Pikrinsäurealkohol u. a. (s. Zellkern). Alkoholmaterial ist nur zum Teil mit fixiertem identisch, da man zur Aufbewahrung in der Regel nur 70 % Alkohol nimmt, der zudem durch Verdunstung (wiederholtes Öffnen des Präparatenglases) und durch das in den Pflanzen enthaltene Wasser noch schwächer wird. Überdies dringt der Alkohol in Pflanzen und größere Pflanzenteile nicht genügend rasch ein, so daß die Härtung (und Fixierung) gewöhnlich unvollkommen ist. Absoluter Alkohol wird selten benutzt. Er ist zu teuer und ruft zu starke Schrumpfungen hervor. Alkohollösliche Substanzen fehlen naturgemäß, scheiden sich bisweilen beim Trocknen des Alkoholmaterials an der Oberfläche desselben aus (Kristalle von Hydrastin, Vanillin, Alantsäureanhydrid u. a.).

Da viele Enzyme durch kalten Alkohol, wie er zum Einlegen benutzt wird, nicht abgetötet werden, so finden im Alkoholmaterial vielfach Spaltungen statt. Anderseits gelangen wasserlösliche Körper (Inulin, Phosphate und andere anorganische Salze) zur Abscheidung. Chlorophyllfarbstoff und andere Farbstoffe werden ausgezogen, die Pflanzen werden mehr oder weniger gebleicht, zuweilen aber auch gebräunt und geschwärzt. Letztere Färbung erscheint selbst beim Einlegen in völlig absoluten Alkohol. In diesen Fällen ist der Alkohol ebenfalls zu langsam eingedrungen und hat die Farbstoff abspaltenden Enzyme nicht sofort abgetötet (Nekrobiose)[1]). Ein Eintragen der Pflanzen, sofort nach dem Abpflücken, auf 10 bis 20 Minuten in siedendes Wasser oder auf einige Minuten in siedenden Alkohol bringt Abhilfe. Darauf werden die Pflanzen in gewöhnlichen Spiritus gebracht. Eine stärkere Nachfärbung ist nicht mehr zu befürchten. Diese „Kochmethode" ist von Heinricher[2]) bei chlorophyllfreien phanerogamen Parasiten und Saprophyten benutzt worden. — Gerbstoffhaltige Zellen fallen in Alkoholmaterial gewöhnlich durch ihre Färbung sofort auf. — Ziemlich weitgehend sind die Veränderungen, welche die Schleimmembranen, die resinogene Schicht, die Aleuronkörner u. a. in Alkohol erfahren.

Sublimat- oder Phenolalkohol leistet im allgemeinen keine besseren Dienste als Alkohol allein.

Recht empfehlenswert ist Alkoholdampf. Auf den Boden eines luftdicht schließenden Gefäßes kommt etwas absoluter Alkohol oder ein mit Alkohol getränkter Wattebausch. Das Material wird an einem Faden am Deckel aufgehängt, ohne daß es mit dem Alkohol in Berührung kommt. — Alkoholmaterial wird leicht brüchig; es wird durch 1—2stündiges Behandeln mit Glyzerinwasser wieder geschmeidig und schneidbar.

Formaldehyd (Formol)[3]) gebraucht man, wenn man die Schrumpfungen und Entfärbungen umgehen will, die das Material in Alkohol erleidet. 40% Formaldehyd (die Handelsware) wird mit dem 2—3-fachen Volumen destillierten Wassers verdünnt. Die Flüssigkeit braucht nur den unteren Teil des Gefäßes zu erfüllen. Die Gefäße müssen luftdicht verschlossen sein. Stärkere Lösungen härten und sollen

[1]) Bei Nekrobiose stirbt das Protoplasma ab, die Enzyme bleiben erhalten und in Tätigkeit (Beijerinck).

[2]) E. Heinricher, Über das Konservieren von chlorophyllfreien, phanerogamen Parasiten und Saprophyten, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1892, IX, S. 321.

[3]) Formaldehyd wurde zur Härtung und Konservierung tierischer Gewebe von F. Blum empfohlen: Das Formaldehyd als Härtungsmittel, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1893, X, S. 314 und: Notiz über die Anwendung des Formaldehyds als Härtungs- und Konservierungsmittel, Anatom. Anzeiger, 1893, IX.

nach Penzig[1]) auch bei Ganzmaterial das Protoplasma fixieren, ohne es zu koagulieren (?). Im allgemeinen bleiben die Farbstoffe erhalten, selbst Blütenfarben, doch werden Pflanzen mit hohem Gerbstoffgehalt bräunlich. Es läßt sich ferner Formoldampf verwenden. Bruns[2]) benutzte bei Florideen eine 1% Formollösung, doch müssen die Algen vor Licht geschützt werden, um ihre Farbe zu behalten, „wenige Tage Belichtung genügen aber meist, um sie mißfarbig zu machen. Von einer Fixierung des Inhalts durch Formalin kann natürlich keine Rede sein." Gleiche Erfolge sollen mit Kampfer versetztes Meerwasser oder eine konzentrierte Lösung von Chlornatrium in Meerwasser liefern. Für Plankton dienen Mischungen von Methylalkohol, Holzessig, Formalin u. a. Setchell und Osterhout[3]) benutzten bei Cyanophyceen 1% Formaldehydlösung, die mit 1% Chromalaun versetzt ist, bei Phaeophyceen 1—2% Formaldehydlösung in Seewasser: bei Rodophyceen erhält 1% Chromalaunlösung am besten die Farbe. Bei quellbaren Algen (Polysiphonia) ist Formolseewasser (1. Formol : 20,0, eine Stunde) zu empfehlen, „danach Abspülen in Seewaser und Übertragen in Alkohol + Seewasser 1 : 9" (Tobler)[4]). Zum Konservieren von Chlorophyceen, vorzüglich ihrer Chloroplasten, wird die Ripartsche[5]) Flüssigkeit benutzt (nach Tempère: Kupferchlorid, Kupfernitrat je 0,2 g, Phenol 1 g, Wasser 99 ccm, Eisessig 1 ccm). — Chalon[6]) hält eine Lösung von 3% Borsäure und 1—5% Natriumsulfat für morphologische Sammlungen als geeignet. — Auch Schwefeldioxyd in wässeriger Lösung[7]) wurde empfohlen und soll sich besonders bei Pilzen bewähren. Die Objekte entfärben sich (die gelbe Farbe hält sich am besten), bleiben aber elastisch. In vielen Fällen wird sich eine konzentrierte alkoholische Lösung von Pikrinsäure eignen, besonders bei Schleimen höherer

[1]) O. Penzig, Das Formalin als Konservierungsflüssigkeit für pflanzliche Präparate, Malpighia 1894 und Ztschr. f. wiss. Mikr., 1895, XII, S. 115; L. Linsbauer, Über einige Versuche über die konservierende Wirkung von Formol, Bot. Centralbl., 1894, LX, S. 364.

[2]) E. Bruns, Beitrag zur Anatomie einiger Florideen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1894, XII, S. 178.

[3]) W. A. Setchell und W. J. V. Osterhout, Some aqueous media for preserving algae for class material, Bot. Gazette, 1896, XXI, S. 140.

[4]) F. Tobler, Fehlergröße einiger Fixierungsmethoden und Quellung einer Algenmembran, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 51.

[5]) Behrens-Küster, Mikr. Tabellen, 1908, S. 79.

[6]) J. Chalon, Liquides conservateurs pour échantillons botaniques en bocaux, Bull. Soc. Bot. de Belgique, XXXVI, S. 39.

[7]) G. Pollacci, Schwefeldioxyd als Konservierungsmittel für Pflanzen, Atti dell' Ist. Bot. dell' Univ. di Pavia, 1900, 2 Ser. VI, S. 165.

Pflanzen, nach Gomont[1]) auch (mit etwas Glyzerinzusatz) bei grünen Süßwasseralgen. Osmiumsäure wird bei pflanzlichen Objekten weniger benutzt.

Getrocknetes Material, auf das man oft ausschließlich angewiesen ist, wird in vielen Fällen, wenn man vom Plasma, Kern und Chromoplasten absieht, gleich gute Dienste wie konserviertes leisten. Von Einfluß auf manche Inhaltsstoffe ist die Art des Trockenprozesses. Verläuft dieser langsam, so finden tiefgreifende Spaltungen statt. Bei schnellem, scharfem Trocknen lassen sich enzymatische Prozesse zum großen Teile ausschalten. Jahrelanges Lagern von Drogen und Herbarpflanzen, vornehmlich bei schlechter Aufbewahrung, kann natürlich weitere Zersetzungen bedingen. Im Zellsaft gelöste Substanzen imprägnieren die organisierten Bestandteile der Zelle, dringen auch in die Membranen ein. Vorzüglich aus Sekretbehältern gelangen leicht flüchtige Bestandteile teils zur völligen Verdunstung und sind nicht mehr nachweisbar, teils an sekundäre Lagerstätten und zur Kristallisation (Alantsäureanhydrid, Santonin, Kampfer). Sehr viele Substanzen kristallisieren in der Zelle bei Wasserentzug aus (Inulin, Fett, Zucker, Hesperidin, Farbstoffe u. a.). Zuweilen wird ein Aufbewahren der lufttrockenen Objekte über Chlorkalzium anzuraten sein. Behält doch selbst Pollen bei sachgemäßer Aufbewahrung über Chlorkalzium seine Keimfähigkeit (s. Chemotropismus).

Zum Aufweichen getrockneter Algen und Pilze bedient man sich der Milchsäure. Die Objekte werden in Wasser aufgeweicht, dann in konzentrierte Milchsäure gebracht und auf dem Objektträger erhitzt, bis keine Gasbläschen mehr hervortreten[2]). Das Verfahren ist auch für Drogen neben der Behandlung von Kalilauge, Chloralhydrat u. a. zu empfehlen.

Beim **Versand** von lebendem Material zu mikrochemischen Studien ist auf die Verpackung zu achten, denn für die Enzyme sind günstige Bedingungen auf dem Transporte gegeben, zumal, wenn dieser längere Zeit dauert. Allgemein gültige Vorschriften für die Verpackung lassen sich nicht geben, da viel von dem Zustand der Pflanzen und von der Dauer des Transportes abhängt. Alkaloidpflanzen, die gleich nach der Ernte trocken in Spankörbchen verpackt und verschickt wurden, haben sich bei Postversand nach eigenen Erfahrungen einige Tage gut gehalten. Die Pflanzen müssen jedoch lose (nicht gepreßt) im Körbchen

---

[1]) H. Gomont, Conseils aux voyageurs pour la préparation des algues, Journ. de Bot., 1906, XX, S. 18.

[2]) G. Lagerheim, Über die Anwendung von Milchsäure bei der Untersuchung von trockenen Algen, Hedwigia 1888, S. 58 und: L'acide lactique, excellent agent pour l'étude des champignons secs, Rev. mycolog., 1889, XI, S. 95.

liegen, so daß die Luft allseitig Zutritt hat; auch darf ihnen äußerlich kein Wasser anhaften. In neuerer Zeit kommt bei Tropenmaterial der Versand in Torfmull[1]) in Blechdosen unter Luft- und Lichtabschluß in Aufnahme, der sich bei Kola[2]) und Ananasfrüchten bewährte und auch für andere Samen und Früchte zweckmäßig sein wird. Seit langem verschickt man Pflanzen in zugelöteten Blechbüchsen, für derbere Objekte recht geeignet. Enzymatische Spaltungen sind naturgemäß nicht ausgeschlossen und wiederholt beobachtet worden (Vanillingeruch bei ganz jungen, nicht fermentierten Früchten von Vanilla). Für Samen, die ihre Keimkraft leicht einbüßen, hat sich gepulverte Holzkohle als geeignetes Verpackungsmaterial erwiesen (Erythroxylon coca)[3]).

Einiges über die Präparation.

Die zu mikrochemischen Reaktionen erforderlichen Schnitte werden überwiegend mit freier Hand geschnitten. Die Technik des Schneidens muß hier als bekannt vorausgesetzt werden. Objekte, die sich nicht gut in der Hand halten lassen, werden zwischen Hollundermark oder wenn sie derb sind, zwischen Kork eingeklemmt. Hierbei bekommt gleichzeitig das in freier Hand gehaltene Messer eine bessere Stütze.

Getrocknetes Material läßt sich ohne weiteres ganz gut schneiden, jedenfalls besser, als vielfach angenommen wird. Von einem Aufweichen in Wasser (oder besser in Glyzerinwasser) und von der oft empfohlenen Vorbehandlung mit verdünnter Ammoniaklösung oder schwacher Kalilauge kann meist abgesehen werden. Diese Vorbehandlung kommt mehr für feinere anatomische Untersuchungen und auch dann nur für Studien der Vegetationsspitzen und der Reproduktionsorgane in Betracht. Einmal werden bei der Vorbehandlung die Zellinhalte verändert, und Schleime u. a. gelöst und dann liefert zwischen Kork eingeklemmtes trockenes Material sogar dünnere Schnitte als lebendes oder erweichtes. Getrocknetes Material kann auch mit dem Mikrotom (s. d.) geschnitten werden. Liegen sehr spröde Objekte vor, dann ist es ratsam, diese über Nacht in eine feuchte Kammer zu bringen, indem man in ein-

[1]) L. Bernegau, Über Verschiffung und Frischhaltung tropischer Früchte in Torfmullpackung, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1911, XXI, S. 162.

[2]) Auf diese Weise versandte Keimlinge keimten und konnten nach einem Jahre im Topf ausgepflanzt werden.

[3]) Es hängt viel von dem Entwicklungsstadium der Samen ab; Kokafrüchte, die nach allgemeiner Ansicht nur 14 Tage ihre Keimkraft behalten, kamen, aus Saigon im Papierbeutel als Warenmuster bezogen, im Botanischen Garten in Bern zur Entwicklung.

facher Weise auf einen tiefen mit Wasser gefüllten Teller eine trockene, die Objekte enthaltende Schale stellt und das Ganze mit einer Glasglocke bedeckt.

Handelt es sich um den Nachweis eines Körpers in den Zellen selbst und über seine Verteilung im Gewebe (Lokalisation), so müssen wir selbstredend die Reaktionen mit den unversehrten Zellen ausführen. Bei zarten Objekten (einzelligen Organismen, Pollen, Zellfäden und -flächen), die durch das Deckglas leicht zerdrückt werden können, bringt man auf dem Objektträger 4 Stützfüßchen für das Deckglas aus Wachs (3 Teile Wachs, 1 Teil Terpentin), Plastin oder erwärmter Kakaobutter an. Praktisch sind auch 2 Stützleisten an den Längsseiten. Schnitte müssen so dick sein, daß sie eine (besser zwei) Reihen völlig unangeschnittener Zellen enthalten. Sind die Zellen relativ hoch (Leitparenchym) oder langgestreckt (Idioblasten, mechanische Elemente), dann wähle man Längsschnitte. Diese sind bei Wurzeln, Stengeln, Blattstielen und -nerven Querschnitten vorzuziehen, da sie nicht so dick zu sein brauchen, um unversehrte Zellen zu enthalten. Überhaupt sind stets bei Lokalisationsermittelungen die an Querschnitten erhaltenen Befunde durch Prüfung von Längs- und Flächenschnitten zu ergänzen. Die Präparation kann besonders bei Blättern einige Schwierigkeiten bereiten. Bei etwas starken Blättern gelingt die Herstellung von Flächenschnitten gut, indem man das Blatt über den Zeigefinger der linken Hand spannt, mit dem Messer die Epidermis schräg anschneidet und das angeschnittene Stück mit der Pinzette abzieht[1]). Nach Entfernung beider Epidermen bleibt gewissermaßen ein Flächenschnitt des Mesophylls zurück. Zur Herstellung von Blattquerschnitten legt man bekanntlich eine Anzahl Blattstückchen aufeinander und klemmt das Päckchen zum Schneiden zwischen Hollundermark ein. Bei starken, lederartigen Blättern (Arctostaphylos, Pilocarpus) kann man sich die Präparation erleichtern. Man schneidet mit einer kleinen, scharfen Schere einfach feine Schnipsel ab. Derartige Schnipsel geben recht brauchbare mikroskopische Präparate.

Stark brüchiges Material, von dem man unbedingt größere Schnitte haben muß, wird man unter Umständen vorteilhaft vor dem Schneiden in Glyzeringelatine (Zusammensetzung s. Dauerpräparate) einbetten. Auch zartes lebendes und fixiertes Material kann mit durch Erwärmen flüssig gemachter Gelatine unter dem Rezipienten der Luftpumpe injiziert werden. Fixierte Objekte müssen zuvor gewässert haben. Durch Einlegen in Alkohol erfährt die eingetrocknete Gelatine eine

---

[1]) In ähnlicher Weise fertigt man Längsschnitte aus Stengeln, Blattstielen u. a. an.

weitere Härtung. Aus den Gelatinestücken werden die Schnitte hergestellt: sie gelangen sofort auf den Objektträger. Wenn erforderlich, kann die Gelatine durch gelindes Erwärmen flüssig gemacht und mit Glyzerin und lauwarmem Glyzerinwasser entfernt werden.

Selbst das Schneiden sehr kleiner Objekte, wie Drüsen, Sporen, Pollen, Algen. ist mit freier Hand möglich. Zu diesem Behufe werden die Objekte mit einer dicken Gummilösung vermischt: die Mischung wird auf einen geeigneten Kork aufgetragen und der Kork an einem staubfreien Orte, evtl. im Exsikkator, bis zum Eintrocknen der Masse hingelegt. Einlegen in Alkohol bedingt weitere Härtung. Die durch die harte Gummimasse mit einem scharfen Messer hergestellten Schnitte führen mehr oder weniger Quer- und Längsschnitte der Objekte.

Einige Hinweise erfordert die Präparation verkohlter Pflanzenteile, da das Schneiden dieser mit einiger Schwierigkeit verbunden ist. weil die Präparate selbst bei vorsichtiger Behandlung leicht zerbröckeln und zerfallen. Es empfiehlt sich, derartiges Material zuvor mit Kanadabalsam zu durchtränken. Das Material gelangt zunächst auf einige Zeit in Xylol (um das Eindringen des Balsams zu erleichtern), dann auf 1 bis 2 Tage in Kanadabalsam und wird schließlich etwa eine Woche hindurch an der Luft trocknen gelassen. Auf diese Weise haben Wittmack und Buchwald[1]) verkohlte Getreidekörner behandelt, die sich nunmehr wie frische anfassen und präparieren ließen. Präparate aus stark verkohlten Pflanzen erscheinen unter dem Mikroskop schwarz und lassen von der Struktur des Gewebes wenig erkennen. Bleichen der Präparate mit einem der üblichen Bleichmittel (s. d.) hat wenig oder gar keinen Erfolg. Netolitzky[2]) hat daher die Aschenskelette der Präparate (s. d.) zur Diagnose herangezogen, die vornehmlich dort, wo verkieselte Membranen vorliegen, gute Dienste leisten. Diese Methode haben Wittmack und Buchwald bei verkohltem Holz benutzt und zunächst größere Stücke des Materials vorsichtig verascht und aus der Asche die Präparate hergestellt. Die Veraschung muß sehr vorsichtig ausgeführt werden, damit das veraschte Pflanzenstück nicht zerfällt. Es wird dann in heißes flüssiges Paraffin übertragen und darin erkalten gelassen. Die in Paraffin eingebettete Asche läßt sich gut schneiden. Die Paraffinschnitte dürfen

[1]) L. Wittmack u. J. Buchwald, Pflanzenreste aus der Hünenburg und eine verbesserte Methode zur Herstellung von Schnitten durch verkohlte Hölzer, Ber. deutsch. bot. Ges., 1902, XX, S. 21.

[2]) Fr. Netolitzky, Mikroskopische Untersuchung gänzlich verkohlter vorgeschichtlicher Nahrungsmittel aus Tirol, Ztschr. d. Nahrungs- u. Genußmittel, 1900, III, S. 401.

auf dem Objektträger nur sehr gelinde erwärmt werden. Bei zu starker Erwärmung wird das Paraffin flüssig und der Schnitt zerfließt. Nun wird das undurchsichtige Paraffin mit erwärmtem Xylol ausgewaschen; ein Tropfen Kanadabalsam dem Präparat zugesetzt und sehr vorsichtig das Deckglas aufgelegt.

Bei der Präparation von Braunkohlenhölzern wandte Triebel ebenfalls Kanadabalsam an und stellte dann Dünnschliffe her, während Schmalhausen die Stücke in glyzerinhaltige Gummilösung legte und nach dem Trocknen Handschnitte anfertigte und Gothan[1]) sich des Wachses bediente. Bei der letztgenannten Methode kommt das Objekt auf 2 bis 4 Minuten in absoluten Alkohol, dann wird eine gute Schnittfläche hergestellt und auf 5 Minuten in geschmolzenes Bienenwachs eingelegt, wobei das Wachs während dieser Zeit durch schwaches Erwärmen flüssig gehalten wird. Sobald nach dem Erkalten das Wachs Butterkonsistenz annimmt, wird das Holzstück herausgenommen und ist nach völligem Erhärten des Wachses schnittfähig. Die Schnitte werden in Glyzerin untersucht, das mit etwas Alkohol versetzt ist.

Bemerkungen über Reagentien und Reaktionen.

Absolute Reinheit der Reagentien ist bei mikrochemischen Arbeiten noch mehr als bei makrochemischen Untersuchungen Grundbedingung, denn bei den minimen Mengen der in Reaktion tretenden Substanzen wirkt jede Beimischung weit leichter störend. Nur in seltenen Fällen ist die Beimischung eines ganz bestimmten Körpers im Reagens vorteilhaft, so beim Alaunnachweis mit Cäsiumchlorid (das eine Spur von Cäsiumalaun enthält). Beim Arbeiten mit Schnitten wird man von dem sog. Impfen absehen (Zusatz einer Spur der gleichen Substanz zu träge und schlecht kristallisierenden Körpern) und selbst beim Arbeiten mit Lösungen umgeht man es tunlichst. Der Konzentrationsgrad der Reagentien, zu deren Herstellung stets destilliertes Wasser genommen werden muß, läßt sich nur von Fall zu Fall bestimmen. Dies gilt auch für die Reagentien auf organisierte Zellbestandteile und auf Membransubstanzen (Jodjodkalium, Chlorzinkjod). Im allgemeinen sind die Reagentien entgegen vielen Literaturangaben, nicht in konzentrierter Lösung anzuwenden. Verschiedene Fällungen lösen sich im Überschuß der Reagenzlösung leicht auf und es wäre wohl am richtigsten, wenn die reagierenden Körper im Verhältnis ihrer

[1]) Näheres bei W. Gothan, Über die Präparation von Braunkohlenhölzern zur mikroskopischen Untersuchung, Naturwiss. Wochenschr., Jena 1904, XIX, S. 574.

Atom- resp. Äquivalentgewichte zusammentreten würden. Bei Schnitten, in denen meist nur geringe Mengen des zu prüfenden Körpers zugegen sind, gelangen somit verdünnte Reagenzlösungen zur Anwendung.

Der **Aufbewahrung der Reagentien** ist besondere Sorgfalt zu widmen. In dieser Hinsicht wird sehr häufig gesündigt. Korkstöpselflaschen mit eingelassener feiner Pipette zum Ansaugen (ohne Gummikappe), die man in den Reagentienblocks antrifft, sind nicht praktisch. Bei den Gummipipetten (Augentropfgläser und -fläschchen) hält sich die Gummikappe nur beschränkte Zeit. Sie wird vorteilhaft in der von Schürhoff[1]) gegebenen Anordnung durch eine Glaskappe ersetzt. Über den oberen Teil des Pipettenrohres kommt ein etwa 1 cm breiter, mit Glyzerin befeuchteter Gummiring und darüber als Ersatz für die Gummikappe ein fest anschließendes, am oberen Ende zugeschmolzenes Glasrohr. Durch Heben und Niederdrücken dieser Glasrohrkappe werden die Reagentien entnommen (Fig. 1). Man wählt am besten durchweg braune Fläschchen (Kobaltglas), die mit verdünnter Salzsäure ausgekocht und mit destilliertem Wasser gründlich ausgewaschen wurden. Vielfach werden sich Flaschen mit eingeschliffenen Glasstöpseln eignen, die mit einer Spur Wachs oder Fett gut eingerieben und bei manchen Reagentien (Chloralhydrat) mit angeschmolzenen Glasstäbchen versehen sind. Bei verdünnten Laugen sind Stöpsel aus gutem Gummi oder Holz längere Zeit haltbar. Für ölig-harzige Flüssigkeiten, insbesondere für Kanadabalsam sind besondere Flaschen im Handel (nach Schuberg, A. Meyer, Kunz-Krause), bei denen ein Beschmutzen des Glases und der Finger ausgeschlossen ist. Bei dem Glase von Kunz-Krause (Pharm. Zentralh. 1912, LIII, S. 36), das von Franz Hugershoff, Leipzig zu beziehen ist, ist der Tropfstab verstellbar und endet in eine „durch einen merklich verjüngten Teil verbundene Kugel“, wodurch „die jederzeitige Absetzung der Flüssigkeit in Form eines, und zwar stets gleich großen Tropfens“ ermöglicht wird. Übrigens müssen relativ oft die erforderlichen Lösungen frisch bereitet werden. Wo diese Vorschrift besteht, befolge man sie und greife nicht aus Bequemlichkeit nach einer, wenn auch „nur einige Tage“ alten Lösung (Alkaloidreagentien). Zur sorgfältigen Aufbewahrung gehört ferner, daß man die Reagentien beim Gebrauch nicht unnötig lange offen stehen läßt. Die Unsitte, Reagentien mit eingetauchtem Glasstabe stunden-

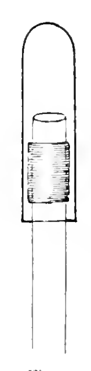


Fig 1. Tropfglas mit Glaskappe nach Schürhoff.

[1]) P. Schürhoff, Pipettenglas für mikroskopische Reagentien, Pharm. Ztg., 1906, LI, S. 931.

lang, selbst über Nacht offen stehen zu lassen, scheint leider vielfach vorzukommen. Es ist doch selbstverständlich, daß, um nur ein Beispiel anzuführen, Schwefelsäure, die häufig gebraucht wird und dabei längere Zeit offen steht, sich nicht mehr in konzentriertem Zustande befindet und leicht zu unrichtigen Resultaten führen muß (bei Membranen). Osmiumsäure, über deren Zersetzung man zuweilen klagen hört, wird nicht durch Licht zersetzt[1]), sondern dadurch, daß beim vielfachen Öffnen und bei langem Geöffnetsein der Flasche oxydierbare Substanzen aus der Luft hineingelangen. Außerdem ist die Laboratoriumsluft zu berücksichtigen.

Bei sachgemäßer Entnahme der Reagentien wird ein längeres Geöffnetsein der Reagenzgefäße umgangen. Sind größere Quantitäten zu einer Reaktion oder zu einer Serie von Reaktionen notwendig, dann füllt man die erforderliche Menge auf ein tiefes Uhrglas oder Schälchen, das mit einer Glasplatte bedeckt wird. Bei der Prüfung von Auszügen, bei der man nur geringe Mengen braucht, bringt man einen größeren Tropfen der Reagenzlösung seitlich auf den Objektträger und entnimmt diesem das nötige Quantum mittels eines feinen Glasstäbchens oder einer Glasöse, über deren Anfertigung Schouten[2]) eingehende Angaben gemacht hat. In den meisten Fällen wird man indessen das Reagens direkt zum Präparate bringen und das Standgefäß sofort wieder schließen. Lösungen, die ausschließlich zum Fixieren und Härten für Färbungen dienen, können, wenn sie sich nicht zersetzt haben, filtriert und weiter verwendet werden. Dies gilt vornehmlich für die teuren Fixiermittel. Bei billigen und einfach herzustellenden Lösungen jedoch (Kaliumdichromat bei Gerbstoffen, Kupferazetat bei Harzen u. a.) sieht man von einer mehrmaligen Verwendung ab.

Überwiegend gelangen die Reagentien in Lösungen zur Anwendung, in neuerer Zeit verschiedentlich auch in Dampfform, selten in fester Form, Die erhaltenen Reaktionen sind Quellungs- und Lösungsvorgänge, oder bestehen in Fällungen und Niederschlägen sowie in Färbungen.

Über die **Ausführung** der mikrochemischen Reaktionen lassen sich nur wenige allgemeine Gesichtspunkte hervorheben. Wir

---

[1]) Osmiumsäure braucht nicht vor Licht geschützt aufbewahrt werden, eine nahezu zweijährige, in einem weißen Glasstöpselglase aufbewahrte Stammlösung ist noch tadellos.

[2]) S. L. Schouten, Methoden zur Anfertigung der gläsernen Isoliernadeln, gehörend zu dem Isolierapparat für Mikroorganismen, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1907, XXIV, S. 258.

wollen mit Hilfe der Reagentien nicht nur die chemische Beschaffenheit der organisierten Bestandteile der Zellen (Membran und Inhalte) feststellen, sondern auch die im Zellsaft in gelöster Form auftretenden Substanzen ermitteln. Vor Ausführung der Reaktion unterrichte man sich eingehend an lebenden Schnitten, bei getrockneten Pflanzen und Pulvern an aufgehellten und an nicht aufgehellten Präparaten über die Gewebselemente und die Zellinhalte. Die Reaktionen werden überwiegend mit den Präparaten (Schnitten, Pulvern, ausgetretenen Sekreten u. a.) direkt vorgenommen oder (in seltenen Fällen) mit den aus den Präparaten in geeigneter Weise gewonnenen Auszügen und Sublimaten. Die letztgenannte Arbeitsweise, bei der eine Lokalisationsermittelung nur unter bestimmten Verhältnissen (bei vorangegangener mechanischer Trennung einzelner Schichten und Organe) möglich ist, hat mehr für angewandte Zwecke Interesse. Sie kommt jedoch auch für all die zahlreichen Fälle in Betracht, für die derzeit eine Methode zur Ermittelung der Lokalisation noch nicht gefunden ist. Ganz allgemein führen wir unsere Reaktionen am Objektträger aus. Während in der reinen Mikrochemie die Reaktionen seit Behrens an dem einen Ende der Objektträger vorgenommen werden, führen wir sie meist in der Mitte der Objektträger aus. Beide Arbeitsweisen haben ihre Vor- und Nachteile, viel hängt von der Gewohnheit ab. Hingegen ist das Arbeiten in Uhrgläsern, wie es in der toxikologischen Analyse seit langem Brauch ist, nicht zu empfehlen, schon weil ein Hantieren mit Uhrgläsern am Mikroskope umständlich ist. Ist man einmal gezwungen, Reaktionen auf Uhrgläsern vorzunehmen, dann leisten die von Kunz-Krause gute Dienste (Pharm. Zentralh. 1912, LIII, S. 49). Sie sind mit einem Ausguß und mit konzentrischer und radiärer Zonenteilung versehen (Bezugsquelle: Franz Hugershoff, Leipzig). Wir benutzen stets die gebräuchlichen Objektträger aus Glas; sie ersetzen ebenfalls die in der Toxikologie bei Farbenreaktionen im Gebrauch stehenden Porzellanplatten. Um Farbenreaktionen makroskopisch verfolgen zu können, hält man den Objektträger abwechselnd über weißes und schwarzes Papier. (Porzellanplatten sind überdies schwer völlig rein zu halten, wahrscheinlich infolge der kleinen Luftblasen, die Tafner (Ztschr. f. wiss. Mikr. 1911, XXVIII, S. 286) in Porzellangefäßen auffand, der den Grund der sogenannten „launischen Reaktionen" in dem Gefäßmaterial vermutet.)

Bei der Ausführung der Reaktion an **Schnitten** und mit Reagenzlösungen verfährt man in verschiedener Weise. Die Präparate kommen auf den Objektträger entweder direkt in einen Tropfen der betreffenden Reagentien und werden mit dem Deckglase bedeckt, oder aber man legt sie zunächst in einen kleinen Tropfen Wassers, legt das

Deckglas auf, setzt am rechten Deckglasrande das Reagens zu und saugt links die überschüssige Flüssigkeit mit einem Streifen Fließpapier ab. Bei dem direkten Eintragen sind Färbungen und Niederschläge besser lokalisiert: letztere entstehen jedoch oft erst nach längerer Zeit. Bei der Durchsaugungsmethode werden bei Trockenpräparaten die eingetrockneten Gewebe durch das kurze Einlegen in Wasser zunächst ihre natürliche Gestalt zum Teil wieder annehmen. Niederschläge entstehen schneller, ihre Bildung läßt sich leichter verfolgen, doch wird die Lokalisation undeutlich, die Fällungen gelangen infolge der Strömung leichter an sekundäre Lagerstätten. In bestimmten Fällen werden die Reagentien durchgesaugt, um die einzelnen Stadien ihrer Einwirkung kennen zu lernen (Chromsäure, Schwefelsäure bei Membranen). In solchen Fällen läßt man das Reagens einige Zeit einwirken und wäscht vor erneutem Reagenzzusatz jedesmal mit Wasser oder Glyzerinwasser aus, um die Wirkung festzustellen.

Besonders zu beachten sind Strömungen, die selbst beim direkten Eintragen der Schnitte lebenden Materials in das Reagens entstehen. Wenn Fällungen an bestimmten Stellen innerhalb lebender Zellen sich anhäufen, so ist diese Erscheinung noch kein Beweis dafür, daß der gesuchte Körper auch an dieser Stelle lokalisiert war. Die Reagentien durchdringen[1]) die Zellwände nicht gleichmäßig an allen Punkten (dünne Membranstellen, Tüpfel), so daß Niederschläge zunächst dort entstehen, wo das Reagens am leichtesten eingedrungen ist. Außerdem ist es nicht ausgeschlossen, daß das eingedrungene Reagens von bestimmten organisierten Bestandteilen (Chromatophoren, Zellkern) der Zelle angesaugt wird, so daß Niederschläge auf diesen zur Ausbildung gelangen können, trotzdem sie in lebendem Zustande die reagierenden Körper nicht enthielten. Auch andere bei der Reaktion nicht beteiligte Substanzen können die Lokalisation der Niederschläge innerhalb der Zellen beeinflussen. Doch sind wir über diese Vorgänge noch sehr wenig unterrichtet.

Umsetzungen von schwer sichtbaren oder leicht löslichen Fällungen in gut sichtbare und unlösliche führt man in neuerer Zeit häufig aus. So werden die schwer sichtbaren gelben Fällungen von Kaliumkobaltnitrit durch Ammoniumsulfid in schwarzes Kaliumsulfid, die leicht lösliche Barytverbindung der Saponine mit Kaliumdichromat in unlösliches gelbes Baryumchromat umgesetzt. Besonders Alkaloidfällungen werden durch Umsetzungen weiter identifiziert (zuerst wohl von Gerock und Skippari, s. Alkaloide). Goldsalze werden durch Schwefelwasser-

---

[1]) Das Eindringen der Reagentien kann in vielen Fällen durch schwaches Erwärmen gefördert werden.

stoff zu Schwefelgold oder durch Eisensulfat zu metallischem Gold reduziert, Quecksilbersalze durch Schwefelwasserstoff als Sulfide kenntlich gemacht.

Reagentien in fester Form gelangen bei Schnitten nur hier und da zur Verwendung. So bringt man an Stelle von Phosphorsäure ein Körnchen Phosphorsäureanhydrid auf den Objektträger, legt den Schnitt darauf, bedeckt mit dem Deckglase und verflüssigt das Reagens durch gelindes Erwärmen. Kristallisiertes Phenol wird beim Nachweis verkieselter Membranen in gleicher Weise benutzt.

Dampfförmige Reagentien wurden zuerst ausschließlich zum Fixieren benutzt (Osmiumsäure). 1876 gebrauchte Herrmann Ammoniakdampf zum Juglonnachweis. Dampfförmige Reagentien werden herangezogen, wenn man bei Jod- und Bromreaktionen störende Färbungen (der Stärke) vermeiden will, wenn die sich bildenden Niederschläge sehr leicht wasserlöslich sind (Alkaloide), oder wenn die Lokalisation einer Farbenreaktion nicht verwischt werden soll (Juglon, Oxymethylanthrachinone). Als dampfförmige Reagentien (Barth, s. Alkaloide) werden benutzt: Jod, Brom, Chlor, Ammoniumkarbonat (Ammoniak), Salzsäure, Salpetersäure. Die Reagentien gelangen in den Fuß eines kleinen Exsikkators, in dessen oberen Teil die Objektträger mit den trockenen Schnitten gebracht werden. Jod wird durch Bedecken mit einer Sandschicht an zu schneller Verdunstung verhindert, Brom wird als Bromkalk benutzt, bei Säuren muß auf niedrige Temperatur geachtet werden, damit nicht gleichzeitig zuviel Wasser mit verdunstet. Der Exsikkator läßt sich natürlich durch andere gut schließende Gefäße ersetzen, in die man passende Glasbehälter stellt, welche die Deckgläser mit den Präparaten aufnehmen. Gleiche Dienste leisten aufeinandergelegte Petrischalen mit eingelegtem Uhrglase als Unterlage für die Objekte sowie die Objektträger mit aufgekitteten hohen Glasringen. Aus Säuren mitgerissenes Wasser wird aus den Präparaten im Schwefelsäure-Exsikkator entfernt. Nach Möglichkeit muß jedoch das Übergehen von Wasserdämpfen durch Kühlstellen des Apparates und durch nicht zu lange Wirkung der Säuren vermieden werden. Denn durch die Wasserdämpfe tritt der Niederschlag leicht aus den Schnitten heraus und gelangt zum großen Teil auf den Präparaten zur Kristallisation. Die Schnitte werden in Paraffinöl untersucht.

Dauerbeobachtung ist überall dort notwendig, wo Fällungen erst nach längerer Zeit entstehen. Aber auch dann, wenn sich Niederschläge sofort bilden, ist es dringend notwendig, die Präparate nach 1 bis 2 Tagen nochmals zu durchmustern, um die etwa eingetretenen Veränderungen festzustellen, die sich vor allem in der Kristallbildung zeigen. Handelt es sich um Auszüge aus Präparaten und um Fällungen

außerhalb der Schnitte, so ist sogar eine Beobachtung nach 1 Woche von großem Vorteil. Man wird erstaunt sein, wie schön manche Körper alsdann herauskristallisiert sind. Insbesondere ist dies notwendig bei Sublimaten, beim Nachweis der Zuckeralkohole, von anorganischen Salzen und Amidokörpern. In anderen Fällen muß die Reagenslösung vor dem Verdunsten geschützt werden. Man schließt daher die Präparate ein, indem man das Deckglas mit Vaselin oder Wachsterpentin luftdicht umzieht. Diese Anordnung hat Siim Jensen beim Nachweis der Alkaloide (s. d.) getroffen. Das Umranden ist nicht gerade bequem, daher habe ich mich folgender Methoden bedient: Die Kontrollschnitte werden auf einem Uhrglase mit dem Reagens gut durchfeuchtet, das Uhrglas wird mit einer Glasplatte bedeckt, so daß ein Verdunsten unmöglich ist. Nach einem Tage werden die Schnitte auf den Objekt-

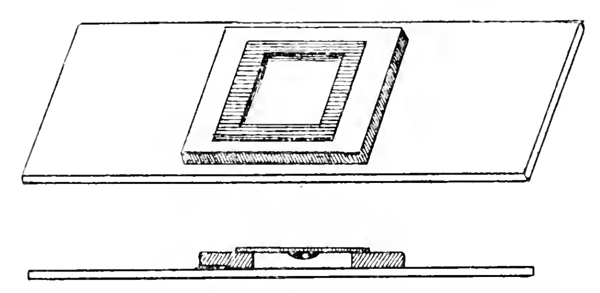


Fig. 2. Feuchte Kammer, angefeuchteter Papprahmen mit aufgelegtem Deckgläschen und Hängetropfen.

träger gebracht und untersucht. Es läßt sich ferner der Hängetropfen in der feuchten Kammer benutzen, die man seit langer Zeit zur Dauerbeobachtung und zur Kultur von Mikroorganismen gebraucht (Fig. 2). Aus einem rechtwinkligen Stückchen Pappe, das so dick, doch nicht ganz so breit wie der Objektträger ist und etwa 3—6 cm lang sein kann, schneidet man ein Fenster aus, dessen lichte Weite etwas geringer als die Größe des Deckglases ist. Den Papprahmen läßt man in Wasser vollsaugen, wischt ihn oberflächlich ab und legt ihn feucht auf den Objektträger. Das Deckglas, das den Reagenstropfen mit den Schnitten enthält, wird mit dem Tropfen nach unten (Hängetropfen) auf den Papprahmen aufgelegt. Feuchtet man den Rahmen durch seitlichen Zusatz von etwas Wasser abends an, so bleibt der Tropfen, ohne zu verdunsten, über Nacht erhalten. Die Beobachtung kann direkt geschehen oder man bringt das Deckglas hierzu auf einen anderen Objektträger. Der Hängetropfen läßt sich ebenfalls auf einem Objektträger anbringen. Das einfachste ist schließlich, für derartige Zwecke einen Objektträger zu führen, auf dem ein 1,5 mm hoher und genügend

weiter Glasring aufgekittet ist (hierzu können die für die Differentialdiagnose der ätherischen Öle angegebenen Objektträger benutzt werden, s. d., sowie die im Handel befindlichen „feuchten Kammern“, Fig. 3). Vielfach läßt sich die Reaktion auf einem Deckgläschen ausführen. Das Deckgläschen mit dem Präparate wird zur Dauerbeobachtung auf einen ausgehöhlten Objektträger gelegt, den man um die Aushöhlung etwas eingefettet hat. Nicht zu empfehlen ist jedoch ein Aufheben der Präparate in der gebräuchlichen Weise unter einer großen Glasglocke, deren Unterlage feucht gehalten wird.

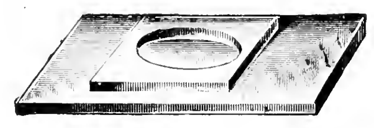


Fig. 3. Feuchte Kammer mit aufgekitteter Zelle. Grübler & Co. Leipzig. 10 Stück = 3 M.

Man versäume nicht, diese Präparate genau zu signieren, sei es mit Fettstift, mit chinesischer Tusche oder mit Papieretiketten.

Auszüge, aus Schnitten oder Pflanzenpulvern mit geeigneten Lösungsmitteln hergestellt, werden im allgemeinen seltener untersucht. Die Extraktion geschieht in einfachster Weise in einem ausgehöhlten Objektträger (Fig. 4). Um zu schnelle Verdunstung des Lösungsmittels zu verhindern, bedeckt man mit dem Deckglase. Auch mit gewöhnlichen Deckglaspräparaten lassen sich Auszüge herstellen. Von einem **Filtrieren** wird man in den meisten Fällen absehen können. Bei quantitativen Arbeiten ist Filtrieren der Auszüge jedoch unerläßlich. Meist wird eine Saugfiltriervorrichtung benutzt, welche aus einer kleinen Glasglocke besteht, die oben 2 Öffnungen besitzt und auf einer Glasplatte ruht. Die eine Öffnung faßt die Filtrierkapillare, welche oben zur Aufnahme des (anzufettenden) Filterchens trichterförmig erweitert ist und unten am Abfluß schräg ausläuft. Durch die zweite Öffnung führt ein Glasrohr zur Wasserstrahlpumpe. Das Filtrat wird in kleine Reagenzgläschen, Schälchen oder in ausgehöhlte Objektträger aufgefangen.

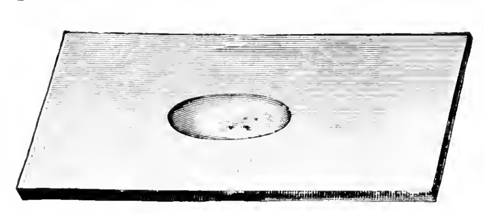


Fig. 4. Ausgehöhlter Objektträger zum Ausziehen von Schnitten und Pulvern, auch als feuchte Kammer zu benutzen. Grübler & Co., Leipzig. 10 Stück = 1,20 M.

Mit dieser Saugpumpe oder mit einer kleinen, ebenso ausgerüsteten Woulfschen Flasche läßt sich Filtration und Extraktion in bequemer Weise verbinden, wie es Grutterink[1]) ausführt. In den

[1]) A. Grutterink, Beiträge zur mikrochemischen Analyse, Dissertation, Rotterdam 1910, S. 34.

Trichter kommt ein Wattepfropfen, darauf die zu extrahierende Substanz, die mit dem Lösungsmittel übergossen wird. Hierbei kann als Trichter ein kleines, spitz auslaufendes Glasröhrchen dienen; der untere Teil der Woulfschen Flasche wird zur besseren Aufnahme der Filtriergefäße (Reagenzgläser, Schälchen) mit Watte oder Sand angefüllt (Fig. 5). — Ein Mikrofilter (feines Glasrohr mit hartem Filtrierpapier) hat für mikroskopische Wasseruntersuchungen Dibdin[1]) angegeben.

Die erhaltenen Auszüge werden in sehr dünner Schicht ausgebreitet und an den Rand mit Hilfe der Platinöse ein kleines Partikelchen des Reagens in fester Form gebracht (Behrens). Das Reagens löst sich und kommt in verschiedenen Konzentrationen mit der zu prüfenden Lösung zusammen. Wendet man Reagenslösungen an, so bringt man einen kleinen Tropfen dieser neben den Auszug und zieht mit der Nadel einen kleinen Verbindungsfaden zwischen beiden Tropfen. Haupterfordernis ist stets: Arbeiten mit sehr dünnen Flüssigkeitsschichten (flachen Tropfen).

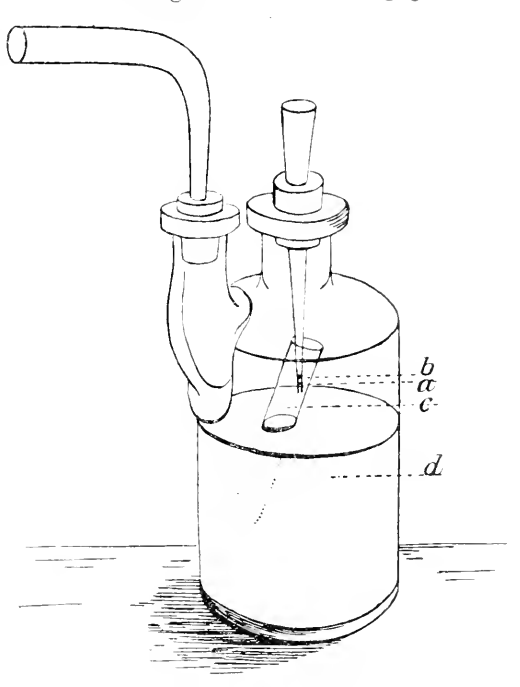


Fig. 5. Extraktionsapparat in $^{2}/_{3}$ der natürlichen Größe (nach Grutterink).
a Wattepfropfen; *b* zu extrahierende Substanz; *c* mikrochemisches Reagenzrohr (absichtlich schief gestellt, damit der Tropfen die Wand berührt und beim Saugen nicht verspritzt); *d* Sand, Watte.

Abschleppen ersetzt bei unseren Untersuchungen, vorzüglich bei der Extraktion auf dem Objektträger, vollkommen das Filtrieren. Wird die Extraktion im ausgehöhlten Objektträger vorgenommen, so hat man nach vollzogener Extraktion nur die Schnitte oder die Pulverpartikelchen mit der Nadel oder einer Platinöse herauszunehmen. Bei der Extraktion unter Deckglas hebt man das Deckglas an einer Kante und stellt es auf der anderen senkrecht auf. Dadurch sammelt sich der Auszug etwas an und läßt sich durch geeignetes Nachhelfen mit der Nadel an eine andere (reine) Stelle

[1]) W. J. Dibdin, The Analyst, 1896, XXI, Nr. 238.

des Objektträgers befördern. In ähnlicher Weise dient das Abschleppen zur Trennung von Niederschlag und Lösung.

Die **Zentrifugalkraft** ist bisher bei mikrochemischen Untersuchungen der Pflanzen noch wenig herangezogen worden. Doch unterliegt es keinem Zweifel, daß beim Nachweis kleinster Substanzmengen in der Zelle ein Zentrifugieren der Objekte vor der Präparation von Vorteil sein wird, da die zusammengeschleuderten Massen relativ leichter zu identifizieren sind. Die spezifisch schwersten Bestandteile werden sich in der Zelle am zentrifugalen Ende ansammeln. Andrews[1]) hat die Wirkung der Zentrifugalkraft bei einigen Objekten (angequollene Samen) studiert und eine Milchzentrifuge benutzt, an deren Scheibe ein Messingzylinder angebracht war, der die Objekte aufnahm. Bei bakteriologischen Studien findet die Zentrifuge oft Verwendung (Kernfärbung der Bakterien [s. d.], A. Meyer). Eine einfache und billige Zentrifuge (Preis ca. 12 M.), die auf dem Prinzip des Trillbohrers beruht, empfahl Cori[2]). Die Zentrifuge für Handbetrieb von H. Behrens ist ebenfalls geeignet[3]) und für mikrochemische Zwecke zu empfehlen (Fig. 6).

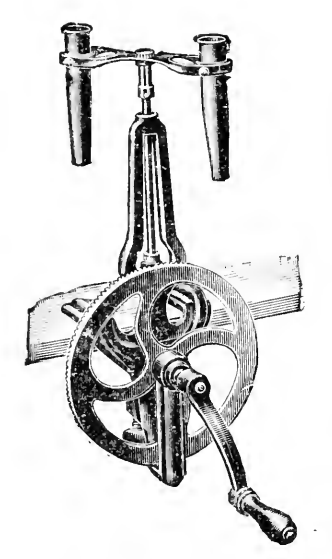


Fig. 6. Kurbel-Zentrifuge d. Ver. Fabr. f. Laboratoriumsbedarf, Berlin N. (Preis 13.50 M.)

Zuweilen kann es nötig sein, selten auftretende Elemente aus Pflanzenpulvern zu sammeln. Die Anreicherung geschieht durch **Sedimentieren.** Das Pulver wird in einem kleinen (weithalsigen) Präparatenglase mit Wasser durchgeschüttelt. Das Gemisch läßt man genügend lange absetzen. Sehr leichte Elemente schwimmen als Schaum an der Oberfläche und können mit einem gebogenen Spatel abgehoben werden, die schweren sind im Bodensatz, den man entweder mit einem Glas-

---

[1]) F. M. Andrews, Die Wirkung der Zentrifugalkraft auf Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1903, XXXVIII, S. 1.

[2]) C. J. Cori, Über die Verwendung der Zentrifuge in der zoologischen Technik und Beschreibung einer einfachen Zentrifuge, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1895, XII, S. 303.

[3]) Ver. Fabr. f. Laboratoriumsbedarf, Berlin N, Scharnhorststr. liefern diese Kurbel-Zentrifuge für 13,50 M. und eine kleine Turbinen-Zentrifuge für Wasserbetrieb, die in der Minute bis zu 8000 Touren leistet, zu 15 M.

rohr abhebt oder durch Dekantieren gewinnt. Kleine Spitzgläschen sind recht geeignet zum Sedimentieren. Wenn erforderlich und angängig, wird die Stärke zuvor durch Kochen mit verdünnter Salzsäure verzuckert. Hartwich[1]) hat einen kleinen Sedimentierapparat konstruiert, der im wesentlichen aus 2—3 gut ineinanderpassenden, sich allmählich verjüngenden Glasröhrchen besteht. Die Röhrchen werden ineinandergeschoben, das mit Wasser oder einem anderen Medium angeschüttelte Pulver eingefüllt und der Apparat in ein kleines Becherchen gestellt. Nach dem Absetzen finden sich in den einzelnen Schichten der Flüssigkeitssäule die verschiedenen Elemente. Jedes Rohr wird einzeln mit seinem Inhalt abgehoben. Bei dem Absetzen spielt die Größe der Elemente eine erhebliche Rolle, kleinkörnige Stärke erscheint in den oberen Schichten, großkörnige in den tieferen Schichten, ebenso die Oxalatkristalle. Der Hartwichsche Apparat ist recht empfehlenswert und sehr preiswert (1,75 Fr.) zu beziehen von Niggli & Co., Zürich III, Zollstraße 44.

Als **direkte Kristallisationsmethode** wollen wir die Methode bezeichnen, bei der unter Deckglas der betreffende Körper aus Schnitten oder aus Pulvern mit einem geeigneten Medium gelöst wird und sich bei teilweiser oder gänzlicher Verdunstung des Lösungsmediums in kristallinischer Form abscheidet. Da die Kristalle in vielen Fällen zumeist am Deckglasrande entstehen, so sind Identitätsreaktionen bequem auszuführen und die Methode kann an Stelle der Extraktion treten. Das Verfahren, das noch viel zu wenig benutzt wird, wurde von Molisch wiederholt herangezogen, so beim Nachweis von Aloin, der Anthocyane und der Algenfarbstoffe, von Borodin beim Dulzitnachweis und leistete mir beim Nachweis von Sorbit, Methysticin, Hydrastin, Agaricinsäure, Juglon u. a. gute Dienste. Als Lösungs- und Kristallisationsmedien kommen nicht nur Wasser und Alkohol, sondern auch Äther, Azeton, Chloroform, Chloralhydrat u. a. in Betracht.

Als **Abziehmethode** sei an dieser Stelle ein Verfahren bezeichnet, das sich zum Nachweis von an der Oberfläche eines Objektes befindlichen Substanzen benutzen läßt. Es kann bei aufgefärbten Gegenständen zur schnellen Ermittlung des benutzten Farbstoffes dienen. Wie mir einige noch nicht abgeschlossene Versuche zeigen, verdient die Methode weitere Erprobung. Streicht man nämlich Kollodium auf einen Objektträger und hebt es nach dem Erstarren ab, dann erhält man ein vollkommen durchsichtiges Häutchen, falls der Objektträger trocken war. An den Stellen, an denen der Objektträger Spuren von Feuchtig-

[1]) C. Hartwich, Die Sedimentiermethode, Schw. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1907, XLV, S. 544.

keit enthielt, ist das Kollodiumhäutchen trübe. Buscalioni und Pollacci[1]) haben diese Eigentümlichkeit zur Ermittlung der Transpiration der Blätter an Stelle der Stahlschen Kobaltmethode benutzt. Diese Kollodiumhäute geben nun die feinsten Skulpturen der Epidermen wieder, erscheinen bei mikroskopischer Betrachtung wie die besten Flächenschnitte. Man wird die Kollodiummethode überall dort anwenden können, wo sich Flächenschnitte schwer herstellen lassen oder aus Schonung des Materials unterbleiben müssen. Jost[2]) hat sie bei fossilen Pflanzen ausprobiert, und bei verschiedenen Harzen gab sie ebenfalls schöne Resultate. Auch Abdrücke von Diatomeenschalen hat man mit Kollodium hergestellt[3]).

Es ist nun ersichtlich, daß das Kollodiumhäutchen alle die der Oberfläche eines Objektes aufgetragenen Stoffe aufnehmen wird, sofern diese im Kollodium löslich sind. Hierzu gehören die in Äther löslichen Körper. Wo Kollodium versagt, muß zu einem anderen hautbildenden Lösungsmittel gegriffen werden. So hat Lagerheim[4]) künstliche Färbungen an Kaffeebohnen ermittelt, indem er die Bohnen in eine sirupdicke Lösung von farblosem Zelluloid in Azeton brachte und diese eintrocknen ließ. Die eingetrocknete Haut nimmt die Farbstoffe auf, wird abgezogen und auf dem Objektträger weiter untersucht. Wir trennen mit der Abziehmethode die an der Oberfläche befindlichen Substanzen auf leichte Weise ab und erhalten sie in möglichster Reinheit, wodurch die weitere Diagnose wesentlich erleichtert wird.

Das **Trocknen** von Sublimaten, Niederschlägen, von mit Säuredämpfen behandelten Schnitten u. a. kann in dem bekannten Exsikkator geschehen. Als Ersatz eignen sich genügend große, weithalsige Präparatengläser mit eingeschliffenen Glasstöpseln, auf deren Boden Schwefelsäure oder Chlorkalzium kommt. Eingestellt wird ein leeres Glas zur Aufnahme der Objektträger. Oft dauert hierbei das Trocknen längere Zeit. Schneller kam ich zum Ziel bei Benutzung eines Objektträgers mit aufgekittetem Glasring als Mikroexsikkator. In die Fassung kommt Schwefelsäure oder Chlorkalzium, der abgeschliffene Rand des Glasringes wird etwas eingefettet, und das Deckglas oder der Objektträger mit dem Niederschlag oder dem Sublimate nach unten wird auf-

---

[1]) L. Buscalioni e G. Pollacci, L'applicazione delle pellicole di collodio allo studio di alcuni processi fisiologici nelle piante ed in particolar modo alla traspirazione, Atti del istituto botanico Pavia, 1902, VII, S. 1.

[2]) L. Jost, Bot. Ztg., 1902, LX_2, S. 266.

[3]) L. Flögel, Arch. f. mikr. Anat., VI, S. 489.

[4]) G. Lagerheim, Färgardt kaffe och dess undersökning, Svensk Farm. Tidskrift, 1905, Nr. 12.

gelegt. v. d. Kolk[1]) benutzt bei kleinsten Mengen einen ausgehöhlten Objektträger, in dessen Höhlung ein Tropfen Säure kommt. Das Deckglas mit der Substanz wird als Hängepräparat aufgelegt. Hierbei muß man bei Schnitten sehr vorsichtig verfahren, um einen Übertritt der Säure zu vermeiden.

Kristallbildung[2]), die wir bei unseren Reaktionen in erster Linie anstreben, wird als Kriterium für die Reinheit der Körper angesehen, vorzüglich, wenn die gleichen Kristalle beim Umkristallisieren entstehen. Bekanntlich gibt es aber Mischkristalle. Es erscheint fraglich, ob bei Sphärokristallen stets einheitliche Körper vorliegen. Bei mikrochemischen Reaktionen, die direkt mit den Präparaten ausgeführt werden, kann Bildung von Mischkristallen sehr leicht erfolgen. Bemerkenswert ist die Feststellung, daß die Amyrine und das Lupeol, die in den Pflanzen sehr verbreitet sind und wahrscheinlich als Ester der Zimt- und Essigsäure vorkommen, in Mischkristallen auftreten, die trotz 3 bis 8 maligem Umkristallisieren mikroskopisch einheitliche Bilder liefern[3]).

Es ist somit erforderlich, mit den erhaltenen Kristallen möglichst zahlreiche **Identitätsreaktionen** anzustellen. Es kommen nicht nur weitere chemische Umsetzungen, sondern auch Lösungsverhältnisse und Farbenreaktionen in Betracht. Bei Lösungen wird man nicht stets die gleichen Befunde, die die Chemie angibt, erhalten. Wir müssen berücksichtigen, daß minime Mengen vorliegen, welche sich bei Anwendung von relativ großen Quantitäten des Lösungsmittels mehr oder weniger lösen können, trotzdem der betreffende Körper makrochemisch als unlöslich bezeichnet wird. So gelingt es bei wiederholtem kräftigem Durchsaugen von Wasser, kleinere Kalziumsulfatkristalle in Lösung zu bringen. Beim Arbeiten mit Geweben dürfen wir außerdem nicht vergessen, daß in den Schnitten andere, uns unbekannte Stoffe zugegen sein können, welche die Lösungsverhältnisse beeinflussen, die Lösungen beschleunigen oder verhindern. Farbenreaktionen bei Kristallen sind recht brauchbar, dienen zwar als Hilfsreaktionen, können aber sogar ausschlaggebend werden.

Den **Kontroll- und Parallelreaktionen** kommt eine sehr große Bedeutung zu. Verschiedentlich ist, und nicht ohne Berechtigung, ein-

---

[1]) L. C. Schroeder v. d. Kolk, Beiträge zur Kenntnis der Mischkristalle von Salmiak und Eisenchlorid, Ztschr. f. phys. Chem., XI, S. 172.

[2]) Durch Benutzung von geätzten Objektträgern läßt sich die Kristallisation nicht befördern; zudem sind geätzte Objektträger schwieriger zu reinigen.

[3]) J. E. Quintus Bosz und N. H. Cohen, Über das sogenannte Chiclegummi, Arch. d. Pharm., 1912, CCL, S. 52.

gewendet worden, daß viele mikrochemische Reaktionen nicht eindeutig sind. Insbesondere gilt dieses für die Farbenreaktionen. Wenn wir beispielsweise mit Schwefelsäure eine Rotfärbung im Gewebe erhalten, so besagt die Reaktion sehr wenig, denn bei Gegenwart von Zucker und Eiweiß erhält man bekanntlich eine Rotfärbung (Raspailsche Reaktion), ebenso bei Gegenwart von Eisen und Gerbstoffen, Fetten u. a. Tritt die Färbung aber auch an gut gewässerten oder selbst an ausgekochten Schnitten ein, dann ist die Farbenreaktion als brauchbare Hilfsreaktion anzusprechen, die sogar bei späteren Untersuchungen und bei weiterer makrochemischer Erforschung des Objektes wegleitend werden kann. Man hat daher seit Errera (s. Alkaloide) sogenannte — Schnitte zur Kontrolle herangezogen. Als — Schnitte bezeichnen wir Schnitte, denen die betreffenden Körper in geeigneter Weise entzogen worden sind (Alkaloide durch Weinsäure-Alkohol, Zucker durch Wasser). Es werden — Schnitte und + Schnitte mit den gleichen Reagenzien behandelt und miteinander verglichen.

Kontrollreaktionen sind ferner mit den Reagentien selbst anzustellen, indem man einen Tropfen der benutzten Lösung auf dem Objektträger eindunsten läßt und den Rückstand durchmustert.

Parallelreaktionen mit chemisch reinen Substanzen müssen, wenn irgend möglich, alle mit dem Pflanzenmaterial erhaltenen Befunde ergänzen. Eigentlich sollten derartige Untersuchungen stets vorausgehen. Leider ist aber nur ein kleiner Teil der Pflanzenstoffe isoliert und genügend gut erforscht. Relativ gering ist die Zahl der isolierten Substanzen, die im Handel zu haben sind, bei denen es überdies noch oft fraglich ist, ob chemisch einheitliche Individuen vorliegen. So ergibt sich denn die Notwendigkeit, bei Pflanzen, deren Chemie noch unbekannt ist, den die Reaktionen bedingenden Körper selbst zu isolieren. Hierbei wird es nicht einmal auf die absolute Reinheit des isolierten Körpers ankommen, so sehr dieselbe erwünscht sein mag, denn im Gewebe treten organische Verbindungen meist nicht in reiner Form in Reaktion; und über die Form, in der die Pflanzenstoffe nativ vorkommen, sind wir nur sehr mangelhaft unterrichtet. Im allgemeinen wird sich die Mikrochemie nach dem Stande der Phytochemie richten müssen.

Die **Bestimmung der Farben**, die bei Farbenreaktionen und Lösungen entstehen, ist ganz vernachlässigt. Zur genauen Feststellung dienen Farbentafeln. Da viele der in der Literatur erwähnten Farbentafeln nicht mehr im Handel zu haben sind, so ist nach Möllers[1])

[1]) H. J. Möller, Internationale Farbenbestimmungen, Ber. d. pharm. Ges., 1910, XX, S. 358.

Ausführungen der Code des Couleurs von Klincksieck und Valette zu empfehlen. Das Werk ist im Verlage von Léon Lhomme, Paris, rue Corneille zu 11 M. erhältlich und enthält auf 24 Tafeln je 30 Farbentöne, zusammen also 720 Farbenangaben.

Beim **Reinigen** verschmutzter Objektträger und Deckgläser vermeide man Kratzen und Schaben mit scharfen Instrumenten. Dadurch entstehen Schrammen, die später beim Mikroskopieren stören. Bei Balsam- und Gelatinepräparaten wird das Deckglas durch gelindes Erwärmen abgehoben. Zum Reinigen wird vielfach Schwefelsäure, sowie Chromatschwefelsäure benutzt[1]) (10 % wässerige Kaliumdichromatlösung mit 10 g Schwefelsäure versetzt). Erwärmen in der Lösung beschleunigt den Reinigungsprozeß. Fette und fettige Harzschmieren reibe ich mit Zeitungspapier ab. Zur Beseitigung teerartiger Sublimationsprodukte sind Säuren nicht geeignet, hingegen leistet mir Abreiben mit konzentrierter Kalilauge die besten Dienste, event. wird mit einem Streichholz etwas nachgeholfen. Millons Reagens wird durch verdünnte Salpetersäure entfernt. Allgemein gültige Vorschriften lassen sich natürlich nicht geben.

Die Mikrosublimation.

In neuester Zeit hat sich die Mikrosublimation als ein brauchbares Hilfsmitel auf unserem Gebiete bewährt. Lokalisationsermittlungen sind mit Hilfe der Sublimation naturgemäß nicht möglich oder doch nur in jenen Fällen ausführbar, in denen eine mechanische Trennung einzelner Gewebeschichten gelingt.

Wir können die Sublimationsmethoden mit Rücksicht auf ihre Ausführung in vier Gruppen zusammenfassen[2]):

1. Erhitzen der freiliegenden Substanz bis zur Dampfentwicklung, Auffangen der Dämpfe durch in der Hand bereit gehaltene Objektträger.
2. Sublimation im sogenannten geschlossenen Raum.
3. Sublimation zwischen zwei Objektträgern oder zwei Glasplatten.
4. Sublimation im luftleeren und luftverdünnten Raum.

Die Mikrosublimation wurde eingeführt von A. Helwig[3]), der sie für toxikologische Untersuchungen (Nachweis der Alkaloide und anderer Gifte) empfahl. Die Methode wurde nachgeprüft von Guy[4]). Ersterer sublimierte zuerst auf einer

---

[1]) Zettnow, Reinigen verschmutzter Objektträger und Deckgläser, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., 1894, XV, S. 555.

[2]) O. Tunmann, Vergleich. Unters. über die Mikrosublimationsmethoden, Apoth.-Ztg., 1912, XXVII, S. 494.

[3]) A. Helwig, Die Sublimation der Alkaloide und ihre mikroskopische Verwertung für die differentielle Diagnose derselben, Ztschr. f. analyt. Chem., 1864, III, S. 43.

[4]) W. A. Guy, On the melting and subliming temperatures of the principal poisons organic and anorganic, Pharm. Journ. and Trans., 1867, 2 ser. IX, S. 370.

Glasplatte, später auf Platinblech, legte um die Substanz 4 Glasleisten und auf diese eine Glasplatte zum Auffangen des Sublimats. Guy verfährt ähnlich, benutzt aber als Unterlage eine Porzellanplatte und nimmt die Sublimation zur Vermeidung höherer Temperaturen auf dem Wasserbade vor. Beide sublimieren im sogenannten geschlossenen Raum. Infolge unberechtigter Kritik kam das Verfahren in Vergessenheit. Erst Behrens[1]) zog es wieder hervor. Er gebraucht die Sublimation hauptsächlich zur chemischen Charakteristik einiger Alkaloide, dann auch zur Trennung schwer flüchtiger Kohlenwasserstoffe, Phenole und aliphatischer Karbonsäuren. Benutzt wird die Objektträgermethode. Zwei Objektträger werden aufeinander gelegt und an einem Ende durch einen kleinen eingeschalteten Glasscherben (Bruchstück eines Objektträgers) auseinander gehalten. In die eine Ecke des unteren Objektträgers kommt die zu sublimierende Substanz. Da Behrens die Körper erst aus dem Pflanzenpulver isolierte, so waren mit der Sublimation nur geringe Vorteile gegeben, denn mit den Auszügen lassen sich die meisten Reaktionen direkt ausführen. Allerdings war mit der Sublimation eine weitgehende Reinigung verbunden. In ähnlicher Weise wird auch jetzt noch in der Chemie gearbeitet, nur vermeidet man den reichlichen Bruch und „erhitzt ebenfalls in der Ecke des Objektträgers; sobald lebhafte Verdampfung einsetzt, wird von der Flamme weggezogen und rasch unter einen kalten Objektträger gebracht, den man in der anderen Hand bereit hält". (Emich, Mikrochemie 1911, S. 20).

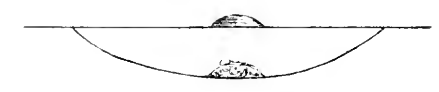


Fig. 7. Anordnung der Sublimationsvorrichtung nach Nestler.

Die Mikrosublimation gewann erst allgemeines Interesse, als Nestler 1901 die Xanthinbasen durch direkte Sublimation aus Pflanzenteilen gewann. Die Sublimation wurde im sog. geschlossenen Raum ausgeführt. Anfangs wurde zwischen 2 aufeinander gelegten Uhrgläsern sublimiert, so daß im Zentrum die Höhe des Sublimationsraumes 1,4 cm betrug. Auf das untere Uhrglas kam die Substanz, dann wurde das andere Uhrglas aufgelegt und mit einer vom unteren Uhrglase 7 cm entfernten Mikroflamme erhitzt. Die Untersuchung des Sublimats in dem Uhrglase unter dem Mikroskop war natürlich umständlich und daher wurde das obere Deckglas später von Nestler durch eine Glasplatte ersetzt. Die Höhe des Sublimationsraumes beträgt jetzt 7 mm, außerdem kam auf die Mitte der Glasplatte ein Wassertropfen zur Kühlung, im übrigen blieb die Anordnung die gleiche (Fig. 7). Die Flamme steht direkt unter dem Uhrglase: die Sublimation beansprucht einige Zeit, eine Temperatur von 80—100° wird in einer halben Stunde erreicht. Höhere Temperaturen verursachen Springen der Gläser. Nestler sublimierte derart Xanthinbasen, Kumarin, Vanillin, Benzoesäure und für leicht flüchtige Substanzen ist das Verfahren recht

[1]) H. Behrens, Anleitung zur mikr. Analyse, 1895—1900, 3. Heft.

geeignet. Diese Methode wurde später von Mitlacher beim Nachweis der Oxymethylanthrachinone sowie von anderen Autoren benutzt.

Um höhere Temperaturen zu erzielen, sublimiert Behrens ebenfalls im geschlossenen Raum in nachstehender Weise: Die Substanz wird auf ein Glimmerplättchen gebracht und ein zuvor ausgeglühter und gepreßter Asbestring aufgelegt (1 mm stark, 8—10 mm lichte Weite). Auf den Asbestring kommt ein Objektträger und das Ganze wird auf einen kleinen Drahtring gestellt. Derart lassen sich größere Flammen, selbst Gebläse zur Erhitzung benutzen, und man kann Bleichlorid, selbst Natrium- und Kaliumsulfat zur Sublimation bringen. Da aber der Objektträger bei höherer Temperatur leicht in der Mitte springt, so ist es ratsam, entweder den Ring in eine Asbestplatte von der Gestalt des Objektträgers anzubringen oder das Sublimat auf Deckgläser aufzufangen. Die Behrensschen Methoden wurden vorzugsweise von den holländischen Forschern benutzt, auf unserem Gebiete besonders von Weevers, der bei der Sublimation alkoholischer Lösungen, die bekanntlich gern breit laufen, das Wijsmannsche kupferne Täfelchen gebrauchte (s. Brenzkatechin).

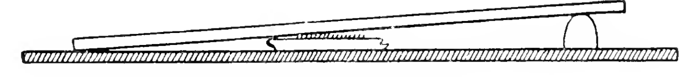


Fig. 8. Mikrosublimation auf der Asbestplatte nach Tunmann.

Die Sublimation auf der Asbestplatte wurde mit Erfolg von Tunmann benutzt. Die Anordnung geht aus Fig. 8 hervor. Auf eine genügend große Asbestplatte (12 × 12 cm) von 2 mm Dicke kommt ein kleines Stückchen eines Objektträgers zu liegen (etwa der vierte Teil eines solchen), größere Glasstücke springen bei höheren Temperaturen leicht. Auf das Glasplättchen kommt die zu untersuchende Substanz. Ungefähr 2—3 cm davon entfernt liegt auf der Asbestplatte ein kleines Holzstäbchen von 3—4 mm Höhe und 6—8 cm Länge. Nun wird der Objektträger derart über die Substanz aufgelegt, daß er mit dem einen Ende auf der Asbestplatte selbst, mit dem anderen auf dem Holzstäbchen ruht. Es ist vorteilhaft, daß der aufgelegte Objektträger (Rezipient) das untere Glasstückchen nicht berührt. Die Höhe des Sublimationsraumes ist bei dieser Anordnung 0,5—1,5 mm. Die Asbestplatte ruht auf einem starken Eisenring, den ich an das Stativ der kleinen Stativlupe von Seibert angeschraubt habe. Dadurch stört der Apparat auf dem Mikroskopiertische nicht. Als Flamme wird eine Spirituslampe benutzt, deren Spitze die Unterseite der Asbestplatte erreicht, und die je nach Bedarf 2—5 cm hoch gehalten wird. Selbstverständlich wird man beim Suchen nach flüchtigen Substanzen zuerst mit kleiner Flamme arbeiten. Die Rezipienten werden nach Beginn der Erhitzung alle Minuten gewechselt. Während man mit der rechten Hand den einen abhebt, wird der in der linken Hand bereit gehaltene

aufgelegt. Das Wechseln kann sehr schnell ausgeführt werden und ist recht handlich, insbesondere wird das Auflegen wesentlich durch die Länge des Holzstäbchens erleichtert. Anfangs ging ich von der in der Literatur vertretenen Anschauung aus, daß das Wechseln der Rezipienten nur zwecks Auffangen mehrerer Sublimate zu geschehen habe. Diese Ansicht erwies sich indessen als irrig. Sublimiert man beispielsweise Rheumpulver ohne Wechselung der Rezipienten einige Minuten, dann entweichen die Sublimationsdämpfe an beiden Seiten. Das Entweichen der Gase erfolgt bei lebhafter Sublimation selbst bei Kühlung des Rezipienten durch aufgetragene Wassertropfen. Der Sublimationsraum ist in solchen Fällen mit Dämpfen in kurzer Zeit völlig erfüllt, die Dämpfe können sich nicht genügend schnell niederschlagen und entweichen seitwärts. Das Entweichen der Gase wird also ebenfalls durch zu reichliche Gasentwicklung veranlaßt. Ein geringer Verlust an Material erfolgt allerdings beim Wechseln der Rezipienten. Dieser wird jedoch durch das leichte und handliche Wechseln auf ein Minimum beschränkt. Außerdem kann man das Wechseln einschränken, indem man das Stäbchen beim Beginn der Sublimation möglichst nahe an die Glasplatte bringt, so daß der Rezipient ebenfalls entsprechend weit nach links zu liegen kommt und nun während der Sublimation Holzstab und Rezipient langsam nach rechts schiebt. Auf diese Weise erhält man ein strichförmig ausgezogenes Sublimat. Doch ist das Wechseln vorzuziehen.

Die abgehobenen Rezipienten kommen mit den Sublimaten nach unten auf ein Gestell; vornehmlich für die ersten Sublimate, welche leicht flüchtige Stoffe enthalten, ist dies angebracht. Von den späteren Sublimaten kann man das eine sofort auf den (kalten) Objekttisch des Mikroskopes bringen und die durch schnelle Abkühlung hervorgerufenen Erscheinungen beobachten. Die Sublimate werden sofort, am nächsten Tage und nach einer Woche untersucht; für die ersten ist baldige mikroskopische Durchmusterung Bedingung, da sich feine Beschläge verschiedener Substanzen schon bei Zimmertemperatur nach einigen Stunden verflüchtigen. Die Beschläge sind genau zu durchmustern. Während beim Auskristallisieren aus Flüssigkeiten Zerrformen und Kristallskelette oft am Rande entstehen, finden wir in den Sublimaten gerade die schönsten Kristalle am Rande und Zerrformen in den zentralen Partien, in denen überdies die Kristalle zuweilen so stark gehäuft sind, daß ihre Formen schwer zu erkennen sind. Versuche, geätzte Objektträger zum Auffangen der Sublimate zu verwenden, um derart die Kristallisation zu befördern, bringen keinen Nutzen (s. auch S. 21, 2).

Bei der Sublimation von Pflanzen**pulvern** (nicht bei Schnitten) können, da der Sublimationsraum sehr niedrig ist, leicht Pflanzen-

teilchen mitgerissen werden, die zu Täuschungen dem Ungeübten Anlaß geben. Es sind meist Membranstücke epidermaler Zellen und von mechanischen Elementen, also doppelbrechende Elemente. Diese Mißstände lassen sich umgehen, wenn man die Pulver mit einem Tropfen Wasser auf der Glasplatte zu einem dicken Brei verrührt (Tunmann, Gehe's Ber. 1911). Alsdann müssen beim Beginn der Sublimation die Rezipienten allerdings öfters gewechselt werden, da die ersten Sublimate naturgemäß größere Flüssigkeitsmengen enthalten. Wir verbinden hierbei die Mikrosublimation mit einer Mikrodestillation. Des weiteren wird man mit einem durchfeuchteten Pflanzenpulver zuweilen bessere Resultate erhalten wie mit einem trockenen. In solchen Fällen müssen wir annehmen, daß die Zellmembranen durch das Durchfeuchten permeabler für die entweichenden Gase geworden sind, oder daß die sublimierenden Körper durch das warme Wasser zuvor in Lösung gingen und in gelöster Form leichter sublimieren. Bei der Objektträgersublimation muß an einem zugfreien Platze gearbeitet werden. Fensterplätze sind aber häufig dem Luftzug mehr oder weniger ausgesetzt. Ein Luftzug verrät sich schon an der Flamme. Darauf hat vornehmlich der Anfänger zu achten. Um in solchen Fällen ein Entweichen der Dämpfe zu verhindern, kann man zwei Objektträger nebeneinander auflegen (die Länge des Holzstäbchens gestattet dies) oder man stellt einen Pappdeckel vor dem Apparat auf, wodurch die Flamme gleichmäßig wirken wird. Ein vorgestellter Pappdeckel von 20 cm Höhe und 10 cm Breite gestattet in allen Fällen die Wahrnehmung der geringsten Dampfentwickelung und selbst sehr schwache Gerüche lassen sich deutlich ermitteln.

Die Vorteile des eingehend geschilderten Verfahrens sind vorzüglich folgende: Der Apparat hat eine stabile Lage, gestattet die Anwendung von Temperaturen bis zu 300° (höhere wurden nicht erprobt), ohne daß Verluste durch Bruch zu beklagen sind, sowie ein leichtes und schnelles Wechseln der Objektträger. Durch die Heranziehung höherer Temperaturen wird die Sublimationsdauer auf fünf Minuten herabgesetzt; auch sind weit mehr Erfolge zu erzielen. Die Methode liefert übereinstimmende Resultate; 1910 haben im Tschirchschen Institut sämtliche Praktikanten ohne weiteres die gleichen Befunde erzielt. Weitere Prüfungen zeigten, daß, bis jetzt wenigstens, in keinem Falle mit anderen Methoden, die zudem komplizierter sind, bessere Resultate erreicht werden. Die einfache Apparatur gestattet die Ausführung der Sublimation neben dem Mikroskop, ein Umstand, der für den Mikroskopiker von wesentlicher Bedeutung ist. Hierzu kommen als weitere nicht zu unterschätzende Vorteile, daß die Sublimate (nach Bedarf in Serien) auf den Objektträgern erhalten werden und schließlich,

daß sich der bei der Erhitzung auftretende Geruch feststellen läßt. Gerade der Geruch, den man bisher nicht beachtete, kann für die Diagnose von großer Bedeutung werden. Manche Pflanzen und Drogen lassen selbst in Mischungen ihren spezifischen Sublimationsgeruch erkennen. Nach einiger Übung lassen sich nicht unwichtige diagnostische Anhaltspunkte herausfinden.

Das geschilderte Verfahren teilt mit allen anderen Methoden den Nachteil, daß es eine genaue Feststellung der Sublimationstemperatur nicht gestattet. Der Chemiker, der mit Recht gewohnt ist, dem Schmelzpunkt und der Sublimationstemperatur großen Wert beizulegen, würde wahrscheinlich diesen Nachteil als einen großen bezeichnen, auf alle Fälle sehr überschätzen. Für die mikroskopische Praxis haben die Sublimationstemperaturen keinen oder doch nur geringen Wert. Die Sublimation verläuft bei den einzelnen Methoden unter verschiedenen Bedingungen. Aus diesem Grunde wurde die Höhe des Sublimationsraumes angegeben. Durch das relativ schnelle Steigen der Temperatur wird jedenfalls die Luft im Sublimationsraume verändert. Mehr oder weniger wird beim Erwärmen die Innenluft entweichen können, auch bei den Methoden mit sogenanntem geschlossenen Raum. Chemisch reine Substanzen liefern zum Teil kurz nach Beginn des Erhitzens schon Sublimate. In solchen Fällen schien die angewendete Temperatur nicht die Höhe erreicht zu haben, welche nach der chemischen Literatur zur Sublimation nötig wäre. Naturgemäß ließ sich das Thermometer nicht in den niedrigen Sublimationsraum einführen. Beobachtungen zeigten aber, daß gerade der niedrige Raum zur Erlangung geringer Sublimationstemperaturen beiträgt, wahrscheinlich durch die schnellere Abkühlung der Dämpfe. Jedenfalls sind bei der geringen Entfernung der aufgelegten kalten Objektträger die ersten Anfänge der Sublimate besser zu beachten als bei makrochemischen Versuchen. Auch waren bei einer Reihe von Substanzen (Kodein- und Hydrastinsalzen) Sublimate bereits sichtbar, ohne daß man, mit bloßem Auge wenigstens, ein Schmelzen der betreffenden Körper bemerkt hätte. In solchen Fällen muß die Sublimation beim Beginn des Schmelzens einsetzen. Schließlich wären die äußerst geringen Substanzmengen zu berücksichtigen, die auch sonst mikrochemische Reaktionen beeinflussen.

Um die Bestimmung der Sublimationstemperaturen einheitlicher zu gestalten, und um Fehlerquellen, welche beim Auflegen des Thermometers auf Platten unvermeidlich sind, nach Möglichkeit auszuschalten, kann man eine Asbestschachtel benutzen (Fig. 9). Man faltet aus einer genügend großen Asbestplatte (also aus einem Stück) von 2 mm Dicke durch Einritzen und Umbiegen eine kleine Schachtel, deren Höhe nur wenig die Stärke des Thermometers übertrifft. Die Schachtel wird mit dünnem Draht zunächst bis auf eine Schmalseite zugenäht, dann werden die Kanten und Ecken innen mit passenden feinen Asbeststreifen ausgelegt und schließlich wird auch die Schmalseite geschlossen. Vorversuche zeigten, daß innerhalb der kleinen Schachtel die Temperatur beim Erwärmen gleichmäßig steigt, Die Schachtel kommt auf einen Drahtring über die Spiritusflamme. An der rechten Schmalseite erhält sie eine Öffnung, durch die das Thermometer eingeschoben wird, welches an seinem oberen Ende (außen) gestützt wird. Die Schachtel

muß so hoch sein, daß das Thermometer weder oben noch unten der Innenwand der Schachtel anliegt. Auf der Oberseite erhält die Asbestschachtel eine zweite Öffnung, in die ein kleines, unten zugeschmolzenes Glasröhrchen eingelassen wird, welches nicht den Boden der Schachtel berührt und an einer Seite dicht an das Quecksilber des Thermometers grenzt. Das obere Ende des Glasröhrchens, das vorteilhaft abgeschliffen ist, steht in gleicher Höhe mit der Oberfläche der Schachtel. Das Glasrohr faßt die zu sublimierende Substanz, läßt sich leicht herausnehmen und reinigen. Man kann die Glasröhrchen umgehen und den Sublimationsraum in noch einfacherer Weise herstellen; man setzt in die Öffnung einen kleinen Glasring ein, für den man in der Schachtel selbst einen Boden aus einem Stückchen Glas bereitet, oder aber man schiebt direkt unter die Öffnung ein Stückchen Glas; in letzterem Falle käme der Sublimationsraum in die Öffnung des Deckels. Außerdem könnte man den Asbestkasten höher gestalten, wodurch das Thermometer in senkrechte Stellung käme. Die Erfolge mit diesem Apparate waren bisher zufriedenstellend. Es kommt ja für uns nicht darauf an, möglichst übereinstimmende

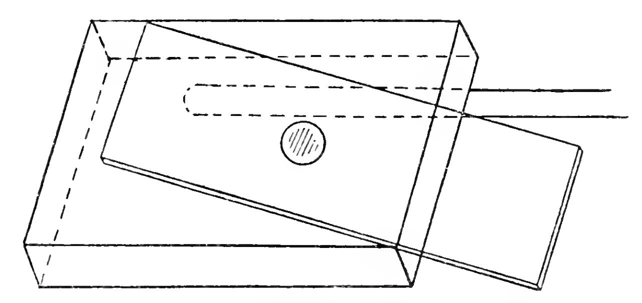


Fig. 9. Sublimation auf der Asbestschachtel zur annähernden Ermittlung der Sublimationstemperatur (Tunmann).

Resultate mit den Temperaturen der Chemie zu erhalten (diese werden bei Benutzung von Drogen und Pflanzenteilen doch kaum zu erreichen sein), als weit mehr darauf, daß verschiedene Beobachter zu übereinstimmenden Werten kommen. Dies ist von vornherein zum großen Teil durch die kleinen Dimensionen der Schachtel gegeben, welche Differenzen durch verschiedenartiges Anbringen von Substanz und Thermometer erschweren.

Die Asbestschachtel[1]) gestattet eine annähernde Feststellung der Sublimationstemperaturen, ohne daß dadurch die Mikrosublimation an sich umständlicher und unbequemer wird, und dies ist ein wesentlicher Vorteil. Denn die Temperaturen, selbst wenn man sie ganz genau angeben könnte, würden uns im Grunde genommen gegenwärtig nicht viel besagen. Die Temperaturen, die uns die Chemie gibt, beziehen sich doch nur auf die isolierten Körper, und zwar in möglichst reinem Zustande. Wir wissen, wie groß der Einfluß von Beimengungen und Verunreinigungen auf den Schmelzpunkt ist. Die Schmelzpunkte der nativ in den

---

[1]) Die Schachtel wird in verbesserter Form von Dr. R. Muencke, Berlin N, Luisenstr. 58, hergestellt.

Pflanzen vorkommenden Substanzen, vornehmlich der primären Glykoside, sind uns noch so gut wie unbekannt. Und in glykosidischer Bindung werden wohl mehr Alkaloide auftreten, als man im allgemeinen glaubt. Die Mikrosublimation ist indessen, selbst ohne Temperaturangaben, ein wichtiges Hilfsmittel bei der Diagnose.

Bei der Sublimation auf der Asbestplatte lassen sich sehr viele Substanzen in großer Reinheit aus den Pflanzenteilen direkt nachweisen (Gentisin, Ferulasäure, Chinasäure, Shikimisäure, Zitronensäure u. a., Fettsäuren, Arbutin-Hydrochinon, Aesculetin-Gelseminsäure, Zuckeralkohole, Rubiaglykoside, Juglone und andere Naphthalinderivate, s. auch S. 24 u. 25). Auch die Spaltlinge verschiedener Substanzen sind unter Umständen diagnostisch wertvoll; zuweilen ist es sogar angebracht, die Hydrolyse mit der Sublimation zu verbinden (Tunmann, Arbutinnachweis), indem man die Substanz mit einer Spur Salzsäure oder mit Enzymlösung vor der Sublimation auf der Glasplatte vermischt. Kristalle sind, zumal bei Heranziehung höherer Temperaturen, in den Sublimaten der meisten Objekte zugegen, vorzüglich nach längerer Aufbewahrung der Sublimate. Nach den eben aufgeführten Substanzen ist dies nicht sonderbar. Die Schwierigkeit liegt in der genauen Bestimmung der Kristalle; und hierbei sind Fehlschlüsse sehr leicht möglich. Nur ein Beispiel. Man erhält aus einem alkaloidhaltigen Pflanzenteil ein kristallinisches Sublimat. Ähnliche Kristallformen liefert bei der Sublimation das reine Alkaloid. Trotzdem ist der Beweis noch nicht erbracht, daß gerade die Kristalle des aus dem Schnitte erhaltenen Sublimates die Alkaloide darstellen, denn diese können im amorphen Zustande zugegen sein und die Reaktionen veranlassen, während die Kristalle von anderen Körpern herrühren.

Bei der Bestimmung der Kristalle sind wir in erster Linie auf die chemischen Reaktionen angewiesen. Einmal gelangen die meisten Substanzen in den Sublimaten in Nadeln und Stäbchen zur Ausscheidung, in Kristallformen, die wenig charakteristisch sind, und dann beeinflussen die Temperaturen die Kristallformen. Vorzüglich Nadeln legen sich gern aneinander und verwachsen zu bandartigen Bildungen (Fig. 10). Auch die Menge ist von Einfluß (s. Fig. b. Ferulasäure). Bei Gegenwart reichlicher Quantitäten vereinen sich Nadeln und Prismen zu Sternen, Sonnen und verwachsen baum- und strauchartig. Auf die Farbe der Kristalle ist ebenfalls nicht immer ein großes Gewicht zu legen. Sehr feine Kristalle gelber Körper (Gentisin, Rubiadinglykosid, Oxymethylanthrachinone u. a.) erscheinen zuweilen bei mikroskopischer Betrachtung farblos. Färbung und Aussehen isolierter Substanzen hängen nicht nur von der Eigenfarbe jener Körper ab, sondern auch von der Kristallform, von der zurückgehaltenen Luft u. a., so daß das

mikroskopische Aussehen einzelner Kristallindividuen meist Abweichungen aufweist.

Zur genauen Ermittlung der Sublimationstemperatur ist für chemisch-toxikologische Zwecke in Anlehnung an die Apparate von Kempf[1]) und Riiber[2]) in letzter Zeit von Eder[3]) ein neuer Apparat konstruiert und bei reinen Alkaloiden erprobt worden. Dieser gestattet Temperaturmessungen an der Stelle, wo der Körper verdampft und wo das Sublimat entsteht. Der Apparat (Jenaer Glas, zu beziehen von A. Wittmann, Zürich IV, Sonnegstr.) besteht aus 2 Rohrteilen von 2,5 cm Weite. Der kürzere, untere Teil (4,5 cm lang) verengt sich unten zu einem Zapfen (1 cm lang, 0,5 cm weit), der die zu sublimierende Substanz aufnimmt. Auf das Zäpfchen kommt das (runde) Deckglas. Am oberen, offenen Ende ist dieser untere Teil mit einem verdickten flachen Rand versehen. Dieser ist sehr fein geschliffen und paßt dicht auf das gleich gebaute untere Ende

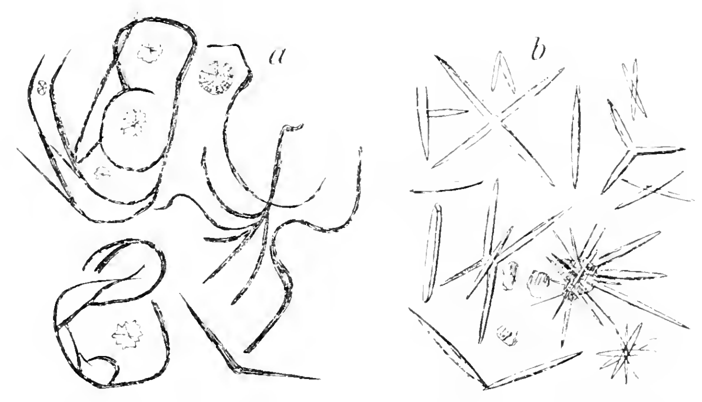


Fig. 10. Kristalle der Oxymethylanthrachinone, aus Rheum auf der Asbestplatte sublimiert: *a*) bei höherer Temperatur, *b*) bei niederer Temperatur. Die bandförmigen Kristalle von *a* lassen sich durch Resublimation bei niederer Temperatur in die kurzen Nadeln von *b* überführen, ebenso die Sphärite von *a* in die Ballen von *b*. Die Kristalle sind nach Photographien kopiert (Tunmann).

des oberen Apparatenteiles. Letzterer ist 12 cm lang, oben etwas verjüngt und mit dem das Thermometer tragenden Kautschukstopfen verschlossen. Das Thermometer reicht bis ans Deckgläschen. Außerdem befindet sich am oberen Teil ein seitliches Ansatzrohr, welches zum Manometer und zur Wasserstrahlpumpe führt. Der Apparat wird in ein Schwefelsäurebad gebracht, dessen Temperatur während der Sublimation durch ein zweites Thermometer gemessen wird. Dann wird die Pumpe in Gang gesetzt und das Bad angeheizt.

---

[1]) R. Kempf, Praktische Studien über Vakuum-Sublimation, Journ. f. prakt. Chem., 1908, LXXVIII, S. 201.

[2]) C. N. Riiber, Ein neuer Sublimationsprozeß, Ber. d. chem. Ges., 1900, XXXIII, S. 1655.

[3]) R. Eder, Über die Mikrosublimation von Alkaloiden im luftverdünnten Raum, Dissert. Zürich, 1912 u. Vierteljahrsschr. Nat. Ges. Zürich 1912, LVII.

Zur Sublimation, besonders zur Bestimmung der Sublimationstemperatur unter dem Mikroskope wird sich mit geringer Änderung ebenfalls die Vorrichtung benutzen lassen, die H. Weber[1]) zur Schmelzpunktbestimmung unter dem Mikroskop angegeben hat (Bezugsquelle: Dr. R. Muencke, Berlin N, Luisenstr. 58). Die Vorrichtung läßt Temperaturen bis zu 200° zu. Der Apparat besteht aus einem Kasten aus Aluminium (25 cm lang, 6 cm breit, 2 cm hoch) und besitzt in der Mitte eine Vertiefung für den Objektträger (Größe 75 : 28 mm). In der Mitte dieser Vertiefung befindet sich eine Öffnung (1,3 cm), welche den Lichtstrahl durchläßt. Auf der Unterseite befindet sich noch ein Schlitz von 4 cm Länge und 2 mm Höhe, auf der Oberseite sind beiderseits der Vertiefung für den Objektträger 2 abnehmbare Tuben für Thermometer angebracht, welche bis zur Mitte in den Apparat hineinreichen. Die Erhitzung erfolgt rechts und links durch 2 Spirituslampen. Das Objektiv muß bei der Beobachtung durch einen Kühlmantel (in dem Wasser zirkuliert) geschützt werden. R. Muencke liefert diesen Mikroskopiertisch einschließlich der Kühlkammer für das Objektiv und Anpassen desselben für 34 M.

Die Erhitzungsmikroskope von Doelter[2]), bei denen Elektrizität als Heizquelle dient, werden sich auch zur Sublimation eignen (Hersteller: C. Reichert, Wien). Für unsere Zwecke werden die einfachen Apparate, die ein Erhitzen bis zu 400° zulassen, vollständig genügen.

Aufhellungs-, Quellungs- und Bleichmittel.

Aufhellungsmittel bezwecken, Präparate oder einzelne Objekte in den Präparaten für die mikroskopische Betrachtung geeignet zu machen. Die zu benutzenden Aufhellungsflüssigkeiten sollen tunlichst keine Formveränderung hervorrufen, besonders keine Schrumpfung; sie müssen möglichst mit wässerigen Flüssigkeiten, fetten und ätherischen Ölen und Harzen mischbar sein (zwecks weiterer Behandlung der Schnitte). Die Aufhellung geschieht dadurch, daß der Brechungsindex der Flüssigkeit dem des Gewebes genähert wird, ferner durch Quellung (doch darf diese nicht zu stark sein) und schließlich durch Entfernung störender Inhaltsstoffe. Viele Mittel kombinieren die genannten Eigenschaften.

Chemische Aufhellungsmethoden werden mit Vorteil besonders dann ausgeführt, wenn die zu untersuchenden Inhalte durch andere

---

[1]) H. Weber, Über Cammidge-Reaktion und Schmelzpunktbestimmung unter dem Mikroskop, Naturf. Vers. Karlsruhe, Verh. (1911), 1912, II_2, S. 125.

[2]) C. Doelter, Ein neues Erhitzungsmikroskop, Sitzber. Wien. Akad., 1909, CXIII, 1. Abt., S. 489, dort Abbild.

Bestandteile der Zelle verdeckt werden oder der Protoplast störend wirkt, wie bei gewissen Membranstudien. Bei der Wahl der Aufhellungsreagentien muß man selbstredend berücksichtigen, daß einmal die störenden Stoffe in gewünschter Weise entfernt werden und daß anderseits der zu prüfende Körper möglichst unverändert bleibt. Ob und inwieweit letzteres der Fall ist, muß durch Kontrollreaktionen mit nicht aufgehellten Präparaten festgestellt werden.

Das beste Aufhellungsmittel ist in jeder Hinsicht die Chloralhydratlösung, welche als mikrochemisches Reagens von A. Meyer[1]) eingeführt wurde. Sie zeichnet sich durch ihr rasches Eindringungsvermögen, durch ihr großes Quellungsvermögen (Stärke wird bis zur Unkenntlichkeit verquollen) und durch ihren Brechungsindex aus. Eine Lösung von 8 Teilen Chloralhydrat und 5 Teilen Wasser stimmt in der Lichtbrechung mit einem Glyzerin mit 67 % Gehalt an wasserfreiem Glyzerin überein ($n = 1{,}4272$, $n_F - n_C = 0{,}00788$ bei 15,3° C) und hat ein spezifisches Gewicht von 1,3677 bei 15° C (Lenz)[2]). In der Praxis achtet man weniger auf eine genaue Konzentration der Lösung, sondern hält eine konzentrierte Lösung (5. Chloral + 2. Wasser oder aus gleichen Gewichtsteilen, letztere spez. Gewicht 1,2315 bei 17° C, $n = 1{,}4479$ $n_F - n_C = 0{,}01318$ bei 15,4° C) vorrätig (zuerst von Lenz empfohlen), von der man soviel zu den Präparaten zusetzt, bis der gewünschte Erfolg erreicht ist, event. wird durch Erwärmen, selbst durch Aufkochen nachgeholfen. Beim Sichtbarmachen mancher Niederschläge (Alkaloide) wird man zunächst eine verdünnte Lösung einwirken lassen und diese erst allmählich durch eine konzentrierte Lösung ersetzen. Zur stärkeren Lösung greife man erst dann, wenn die schwächere Lösung selbst nach mehreren Stunden oder nach einem Tage ohne Erfolg war. Das Chloralhydrat der Apotheken genügt stets in bezug auf Reinheit unseren Anforderungen. Sollte sich das Chloralhydrat infolge schlechter Aufbewahrung zersetzt haben, insbesondere Salzsäure enthalten (mit Silbernitrat sofort einen Niederschlag geben), so würde dieser Umstand zwar nicht beim Aufhellen der Gewebe, wohl aber beim Nachweis von kleinen Oxalaten u. a. zu Irrtümern Anlaß geben können. Man kann dann mit Tschirch[3]) die Lösung mit kohlensaurem Kalk digerieren und nach dem Absetzen durch Glaswolle filtrieren. Eine konzentrierte alkoholische Lösung, die schon Zimmermann[4]), allerdings nur zur

[1]) A. Meyer, Das Chlorophyllkorn, 1883, S. 29.

[2]) W. Lenz, Bemerkungen über die Aufhellung und über ein neues mikroskopisches Aufhellungsmittel, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1894, XI, S. 18.

[3]) Anatomischer Atlas, Nachträge.

[4]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik, S. 10.

schnellen Extraktion von Chlorophyll empfahl, leistet beim Entfernen schwer löslicher Harze und eingetrockneter Fette gute Dienste. Ihr Quellungsvermögen ist nicht so groß (Tunmann)[1], wodurch bei Schleimmembranen ein wesentlicher Vorteil gegeben ist.

Auch ganze Blätter, bei denen man die Verteilung von Oxalaten und anderen, in Chloralhydrat unlöslichen kristallinischen Ausscheidungen (Hesperidin, Scutellarin) ermitteln will, lassen sich meist ohne weiteres durch Aufkochen mit (konz.) Chloralhydratlösung aufhellen. Man kann die Quantität der Kristalle derart annähernd abschätzen und nimmt zweckmäßig das polarisierte Licht zu Hilfe. Oft ist es vorteilhaft, die Farbstoffe zuvor mit Alkohol auszuziehen oder alkoholisches Chloral zu benutzen. Bei ganz alten Blättern genügt Alkohol allein nicht, sondern die Blätter werden „zunächst 2—7 Tage in mit schwefliger Säure gesättigten absoluten Alkohol gesetzt, letzterer 2—3 mal gegen reinen Alkohol gewechselt" und dann erst mit Chloral behandelt (Wehmer)[2]. Hier geht dem Aufhellen ein Bleichungsprozeß voraus (s. Bleichmittel, S. 37). In der Anatomie wird in gleicher Weise Schultzes Mazerationsgemisch und Chloralhydrat vielfach angewendet, u. a. von Virchow[3]). Aber diese Methoden sind nicht allgemein brauchbar, wie man nach der Literatur glauben könnte, sondern beziehen sich nur auf spezielle Fälle, denn wenn wir Blätter von Rheum-Arten mit dem Mazerationsgemisch bleichen und in Alkohol auswaschen, dann werden die gebleichten Stücke durch Chloralhydrat rotbraun (H. Miller und Tunmann).

Eau de Javelle wurde als Reagens in der tierischen Histologie seit 1882 von Noll (Vater) benutzt und von Noll[4]) (Sohn) 1885 in die botanische Mikrotechnik eingeführt. Die Javellesche Lauge ist ein vorzügliches Lösungsmittel für Plasma; Stärke wird schwer angegriffen. Sie bleicht schneller als Chloralhydrat. Doch steht sie in vieler Hinsicht hinter diesem zurück. Sie findet namentlich Anwendung bei Membranstudien, zum Aufhellen der Vegetationspunkte, zu embryologischen Studien u. a. Gewöhnlich wird unter Deckglas aufgehellt, bei Membranstudien im bedeckten Schälchen. Bei längerer Einwirkung scheidet

[1]) O. Tunmann, Beitr. z. Kenntnis der Hautdrüsen, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1908, XVIII, S. 503.

[2]) C. Wehmer, Das Verhalten des oxalsauren Kalkes in den Blättern von Symphoricarpus, Alnus und Crataegus, Bot. Ztg., 1889, XLVII, S. 142.

[3]) H. Virchow, Über Bau und Nervatur der Blattzähne und Blattspitzen mit Rücksicht auf diagnostische Zwecke im Gebiet der Pharmakognosie, Arch. d. Pharm., 1896, CCXXXIV, S. 92.

[4]) F. Noll, Eau de Javelle, ein Aufhellungs- und Lösungsmittel für Plasma, Bot. Centralbl., 1885, XXI, S. 377.

sich unter dem Einfluß der Luft Kalziumkarbonat aus, welches mit verdünnter Essigsäure zu entfernen ist.

Die Lauge, die gut verschlossen und vor Licht geschützt aufbewahrt werden muß, kann mit Kalium- oder Natriumkarbonat bereitet werden. Zu einer Anreibung von 20,0 Chlorkalk und 175,0 Wasser kommt eine Lösung von 25,0 Natriumkarbonat in 75,0 Wasser. Die Mischung wird nach 4tägigem Stehen im Dunkeln filtriert und so lange mit 10 % Kaliumoxalatlösung versetzt, bis ein Niederschlag entsteht. Nach dem Absetzen wird nochmals filtriert[1]). Man kann auch eine Anreibung von 20,0 Chlorkalk und 100,0 Wasser mit einer Lösung von 15,0 reiner Pottasche in 100,0 Wasser versetzen und nach mehrstündigem Stehen filtrieren. Überschüssiger Kalk wird durch Zusatz einiger Tropfen Pottaschelösung entfernt (Noll).

Kalilauge war früher das bevorzugte Aufhellungsmittel und wurde von Hanstein[2]) zum Aufhellen der Vegetationspunkte und bei embryologischen Studien empfohlen. Nicht nur Schnitte, sondern auch Blätter, Stengel u. dergl. werden aufgehellt. Bei Schnitten wird eine verdünnte, bei Pflanzenstücken eine etwas stärkere (keine konzentrierte) Lösung benutzt. Über die Dauer der Einwirkung entscheidet die Beschaffenheit der Objekte. Nach der Behandlung mit Lauge folgt Auswaschen mit Wasser und Neutralisation mit Essigsäure oder verdünnter Salzsäure. Tritt bei der Neutralisation zu starke Trübung ein, dann wird mit verdünntem Ammoniak ausgewaschen. Zu durchsichtig gewordene Schnitte erfahren eine Nachbehandlung mit wässeriger Alaunlösung. Russow benutzte eine alkoholische Lauge, um zu starke Quellung zu vermeiden.

Phenol[3]) (kristallisierte Karbolsäure mit 10 % Alkohol versetzt) wurde von Leitgeb bei Moosen zur Aufhellung benutzt, hat sich aber wenig eingebürgert. Schnitte werden beim Erwärmen oft zerstört. Bei Pilzen, Algen, Drogen leistet Milchsäure (vergl. S. 5) gute Dienste. Amann[4]) empfiehlt, speziell für Kryptogamen, Laktochloral (Chloralhydrat und Milchsäure 1 + 1, n = 1,4796), Chloralphenol, n = 1,5241 (2. Chloralhydrat, 1. krist. Phenol), Chlorallaktophenol, n = 1,4932 (2. Chloral, 1. krist. Phenol, 1. sirupdicke Milchsäure), p-Monochlorphenol, n = 1,5671, sowie für Diatomeen Chinolin. Auch verdünnte Mineralsäuren (verdünnte Salpetersäure) werden zuweilen zum Aufhellen benutzt.

---

[1]) A. Meyer, Grundlagen und Methoden f. d. mikr. Unters. von Pflanzenpulvern, 1901, S. 15.

[2]) J. Hanstein, Die Scheitelzellgruppe im Vegetationspunkt der Phanerogamen, Bot. Ztg., 1868, XXVI, auch Festschr. niederrh. Ges., Bonn 1868, S. 108 und Russow, Mém. de l'Acad. de St. Pétersbourg, sér. VI, XIX, S. 15.

[3]) C. Naegeli u. S. Schwendener, Das Mikroskop, 1877, S. 476.

[4]) Jules Amann, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1899, XVI, S. 38.

Chloralhydrat kann zuweilen, abgesehen von dickeren Präparaten, durch Natriumsalicylat (1 + 1, Brechungsindex 1,449) ersetzt werden, welches mit Nelkenöl (und Phenolen) mischbar ist. Die Schnitte lassen sich somit aus dem Salicylat direkt in Nelkenöl übertragen[1]). Aufhellungsmittel sind schließlich in speziellen Fällen alle Flüssigkeiten, die den die Beobachtung störenden Bestandteil herauslösen (Alkohol, Äther bei fetthaltigen Geweben). Ammoniak ist bei Polyporus officinalis und wahrscheinlich auch bei anderen harzhaltigen Pilzen u. a. das beste Aufhellungsmittel (Tunmann)[2]), die Agaricinsäure (das Harz) wird sofort gelöst, schneller als von Chloral, ohne daß wie in diesem die Hyphenmembran zum Quellen kommt.

Physikalische Aufhellungsmethoden werden ausgeführt mit Flüssigkeiten, deren Brechungsexponent dem des zu prüfenden Objektes nahe kommt. Gewöhnlich wendet man konzentriertes Glyzerin an, ferner fette Öle (Olivenöl, Rizinusöl), doch auch konzentrierte Rohrzuckerlösung, Pyridin, Xylol, Anilin u. a. Vorzügliche Aufhellungsmedien sind die ätherischen Öle und die Balsame; bei ihnen, zum Teil auch bei Glyzerin, ist zur Vermeidung von Kollaps eine Vorbehandlung der Schnitte notwendig. Hierzu wird man in vielen Fällen auch heute noch die einfachsten von Overton[3]) angegebenen Methoden verwenden können. Die Schnitte kommen in ein Uhrgläschen in stark verdünnte Lösungen (10%), die mit Alkohol (bei ätherischen Ölen) oder mit Wasser (bei Glyzerin) bereitet sind. Das Uhrgläschen wird in den Exsikkator gebracht. Die Lösungen konzentrieren sich allmählich durch Verdunstung des Alkohols und des Wassers, so daß die Präparate schließlich völlig in Öl oder in fast konzentriertem Glyzerin liegen. Bei Anwendung eines Schwefelsäureexsikkators beschleunigt schwaches Erwärmen des Exsikkators auf 35° die Konzentration bedeutend[4]). Aus Glyzerin können selbst zarte Objekte auch mit absolutem Alkohol behandelt werden, ohne daß Schrumpfungen erfolgen. Will man mit Kanadabalsam aufhellen, dann werden die Objekte zunächst in Xylol übergeführt, indem man sie in einem Uhrglase in eine 10%-Lösung von Xylol in Alkohol bringt und das Uhrglas in einen Exsikkator stellt, dessen Fuß reines Xylol enthält. Nach einigen Stunden ist die xylolhaltige Präparatenlösung genügend

---

[1]) W. Lenz, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1894, XI, S. 21.

[2]) O. Tunmann, Schw. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1909, XLVII, Nr. 11.

[3]) E. Overton, Mikrochemische Mitteilungen aus dem botanischen Laboratorium der Universität Zürich, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1890, VII, S. 9.

[4]) F. Pfeiffer v. Wellheim, Zur Präparation der Süßwasseralgen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1894, XXVI, S. 674.

konzentriert[1]). Aus Xylol können die Präparate, ohne daß Kollaps erfolgt, in Xylol-Kanadabalsam übertragen werden.

Als **Quellungsreagentien** kommen die vorstehend genannten chemischen Aufhellungsreagentien in Betracht, außerdem werden herangezogen verdünnte Chromsäure (Stärke), verdünnte Schwefelsäure, Kupferoxydammoniak, Ammoniak, verdünnte Salpetersäure, Kaliumquecksilberjodid (Membran). Die meisten (wasserlöslichen) Schleime quellen bereits bei Zutritt von stark verdünntem Alkohol. Der Quellung bedient man sich zur Sichtbarmachung feinerer Strukturverhältnisse.

Als **Bleichmittel** dienen zunächst stärkere Aufhellungsreagentien, Eau de Javelle, Salpetersäure u. a.; dann mit schwefliger Säure gesättigter Alkohol, und in neuerer Zeit hat sich Wasserstoffsuperoxyd vielfach bewährt. Es ist aber nur in ziemlich konzentrierten Lösungen wirksam und wird nach Carazzi[2]) vorteilhaft ersetzt durch Natriumperborat. „Bei gewöhnlicher Temperatur lösen 100 ccm Wasser 2,5 g Natriumperborat; erhitzt man aber das Wasser auf 30—35°, so löst sich das doppelte Quantum. Fügt man dann ein wenig Zitronen- oder Weinsäure hinzu, so kann man die Sauerstoffmenge auf das Zehnfache des ursprünglichen Volumens erhöhen.“ Bei Anwendung einer alkoholischen Lösung (50—70% Alkohol) ist der Zusatz der Säure unbedingt erforderlich. Bei dem Bleichverfahren von Alfieri[3]) kommen die Schnitte in Kaliumpermanganat (1 : 2000), und dann wird das niedergeschlagene braune Manganoxyd durch Oxalsäure (1 : 300) entfernt. Die Prozedur muß bis zum gewünschten Erfolg eventuell einige Male wiederholt werden. In dieser Weise hat Lagerheim[4]) Torf gebleicht, der an der Luft schwarz geworden war. Der Mazeration mit Permanganat folgte eine Behandlung mit 3% Oxalsäurelösung im Sonnenlichte. Energischer wirkt Chlorwasser, das auch einfacher in der Anwendung ist. Der Objektträger mit dem Präparate wird auf die Öffnung der Chlorwasserflasche gelegt. Am stärksten bleicht im allgemeinen Schultzes Mazerationsgemisch (konzentrierte Salpetersäure mit einigen Kristallen Kaliumchlorat, s. Mazeration) oder nach Mayer[5]) ein Gemisch von Salzsäure und Kaliumchlorat (Entwicklung von Chlor und Unterchlorsäureanhydrid). Die Wahl des Bleichmittels hängt naturgemäß in erster Linie von der

---

[1]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik, 1892, S. 16.

[2]) D. Carazzi, Zur Bleichtechnik, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1900, XXVI, S. 526.

[3]) Alfieri, Monit. Zool. Ital., 1897, VII, S. 57.

[4]) G. Lagerheim, Torftekniska Notiser, Geol. Fören. Förhandl., 1903, XXIV, S. 407.

[5]) P. Mayer, Zur Bleichtechnik, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1907, XXIV, S. 353.

chemischen Beschaffenheit des zu bleichenden Gegenstandes ab. Das Bleichungsverfahren, an sich bereits ein Aufhellungsverfahren, wird oft durch chemische Aufhellungsreagentien verstärkt.

Mazerationsmethoden.

Unter Mazeration versteht man die Isolierung von Zellen aus den Geweben. Die Methode dient bei histologischen, weniger bei mikrochemischen Studien und gestattet die Gestalt und Größe der einzelnen Zellen zu ermitteln. Die Zellen werden durch die Mittellamelle (Interzellularsubstanz) zusammengehalten, welche sich aus Pektinsubstanzen aufbaut (s. Pektinmembran), die im Laufe der Entwicklung vielfach ihre Zusammensetzung ändern. Die Mittellamelle ist in ständiger Metamorphose begriffen, sie verschleimt oft. Diese Verhältnisse sind bei der Mazeration zu berücksichtigen. Zuweilen wird die Isolierung schon durch längeres Kochen mit Wasser erfolgen. In solchen Fällen darf man das Isolierungsvermögen nicht ohne weiteres dem Wasser zuschreiben, sondern muß die im Gewebe anwesenden Substanzen berücksichtigen. Denn wenn wir Schnitte von Rumex durch Kochen mit Wasser mazerieren, so beteiligen sich hierbei jedenfalls auch die in den Zellen befindlichen löslichen Oxalate. Überwiegend werden jedoch stark wirkende Reagentien erforderlich sein; die hauptsächlichsten sind hier angeführt:

Schultzes Mazerationsgemisch steht an erster Stelle, ist bei der Mazeration festerer Gewebe (Holz) unerläßlich und wurde hierzu bereits von Sanio[1]) vielfach erprobt. Bei Schnitten kann die Isolierung unter Deckglas vorgenommen werden. Die Schnitte werden auf dem Objektträger mit Salpetersäure und einigen Körnchen chlorsaurem Kalium versetzt (die dem Volumen nach den Schnitten entsprechen), das Deckglas aufgelegt und erwärmt. Vorteilhafter ist es indessen, schon um selbst sehr große Elemente (Bastfasern) im ganzen Zustande zu erhalten, 2 mm starke und genügend lange Stücke im Reagenzglase mit dem Gemisch bis zur Entwicklung brauner Dämpfe zu erwärmen. Die Stücke werden gebleicht, zerfallen zum Teil in kleinere Teile. Einige Minuten nach dem Erkalten der Flüssigkeit wird diese mit den Objekten in eine große Schale mit Wasser gegossen. Das Wasser wird 2—3 mal abgegossen und durch neues ersetzt, dann werden geeignete Stückchen auf dem Objektträger in Wasser oder in Glyzerin zerzupft. Die Reaktion darf nicht im Mikroskopierzimmer, sondern muß unter dem Abzuge vorgenommen werden.

[1]) C. Sanio, Üb. d. Zusammens. d. Holzkörpers, Bot. Ztg. 1863, XXI, S. 632.

Konzentriertes Ammoniak hat (neben Kalilauge, Chromsäure u. a.) von Höhnel[1]) zur Isolierung der Gewebselemente von tierischen Wollen und Haaren benutzt. Richter[2]) führte das Reagens zu diesem Zwecke in die botanische Mikrotechnik ein. Die Mazeration mit Ammoniak läßt sich durch höhere Temperaturen beschleunigen. Siedendes Ammoniak mazeriert das Parenchym der Kartoffel nach 1 Minute, das Endosperm von Rizinus nach 5, Stengelstücke von Cucurbita Pepo nach 15—20 Minuten; Stärke, Aleuronkörner, Chlorophyllkörner, Siebröhren bleiben dabei noch gut erhalten. Warmes Ammoniak von 40° mazeriert das Holz von Taxus baccata nach 4, das von Diospyros Ebenum nach 11 Tagen, kaltes Ammoniak das Periderm der Kartoffel nach 23 Tagen. Das Richtersche Verfahren, das Molisch zur Isolierung der Milchröhren benutzte, hat den Vorteil, daß die Zellinhalte relativ gut erhalten bleiben.

Für krautartige Gewächse führte A. Fischer[3]) Mazeration mit Glyzerin-Schwefelsäure ein. Die Präparate kommen unter Deckglas in Glyzerin, alsdann wird am Deckglasrande ein Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt und eine halbe Minute lang aufgekocht. Nur bei starken Präparaten koche man 1 Minute. Längeres Kochen ist zu vermeiden, da die Membranen sonst zu stark quellen. Die einzelnen Zellen werden durch einen Druck auf das Deckglas voneinander getrennt. Durch halbstündiges Kochen mit 10% wässeriger Natriumkarbonatlösung (Vétillard)[4]) erfolgt nur unvollständige Trennung. In vielen Fällen wird Kochen mit 50% Kalilauge gute Dienste leisten, während die Mazeration mit Chromsäure[5]), deren Konzentration von Fall zu Fall erprobt werden muß, jetzt weniger geübt wird. Die Isolierung mit Chromsäure geschieht vorteilhaft unter Deckglas bei ständiger mikroskopischer Kontrolle. Nach einer 1—3 Minuten langen Einwirkung der Säure wird mit Wasser ausgewaschen; dann lassen sich die Schnitte zerzupfen, oder man muß die Prozedur wiederholen. In speziellen Fällen mazerierte Solla[6]) Früchte mit Oxalsäure oder mit Weinsäure, Möhren und Kartoffeln mit Essigsäure,

---

[1]) F. v. Höhnel, Die technisch verwendeten Faserstoffe, Wien 1888.

[2]) O. Richter, Ein neues Mazerationsverfahren für Pflanzengewebe, Öster. bot. Ztschr., 1900, LV, S. 5.

[3]) A. Fischer, Neue Beobachtungen über Stärke in Gefäßen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1886, IV, S. 97.

[4]) M. Vétillard, Etudes sur les fibres végétales textiles, Paris 1876.

[5]) L. Dippel, Anwendung des Mikroskopes auf die Histologie der Gewächse, 2. Aufl., Braunschweig, 1898, S. 215.

[6]) R. Solla, Beiträge zur Kenntn. d. chem. u. phys. Beschaffenheit der Intercellularsubstanz, Öster. bot. Ztschr., 1879, XXXIV, Nr. 11.

Wille Laminarien mit Säuren und Sodalösung, Macallum Cyanophyceen mit Pikrinsäure, Kroemer Korkgewebe mit Eau de Javelle. Allgemeine Anwendung kann Salzäure-Alkohol mit Nachbehandlung mit Ammoniak finden (Mangin), doch wird diese Methode, da zeitraubend, zur Mazeration wenig benutzt (vergl. Pektinmembran).

Unter Umständen wird man die Mazeration gleichzeitig mit Aufhellungsmitteln kombinieren. Auch Natriumsalicylat ist benutzt worden. Die Columella der Illicium-Früchte brachte Lenz[1]) in kleine mit Natriumsalicylat (1 + 1) gefüllte Fläschchen (von 3 ccm Inhalt, sog. homöopathische Gläschen), die, gut verschlossen, $^1/_2$ Stunde in strömendem Wasserdampf erhitzt wurden. Die Fruchtspindeln sind nun so weich, daß sie ohne Benutzung schneidender Gerätschaften zerkleinert werden können. Alsdann werden die Objekte nacheinander mit heißem Wasser, Eau de Javelle, Salzsäure und Alkohol behandelt.

Bemerkungen über die Mikrotomtechnik.

Das Mikrotom kann in der Mikrochemie bei gewissen Studien nicht entbehrt werden. Daß cytologische Studien sich nur mit Mikrotomschnitten ausführen lassen, ist bekannt. So hat sich leider die Ansicht herangebildet, daß das Instrument nur für den Cytologen notwendig ist. Ohne dem Schneiden mit freier Hand die erste Stelle absprechen zu wollen, wird man doch der Überzeugung sein müssen, daß verschiedene Fragen der Mikrochemie nicht ohne Mikrotom in wünschenswerter Weise lösbar sind. Überall dort, wo Serienschnitte erforderlich sind, bedarf es des Mikrotoms. Bei Membranstudien wird man öfters auf sehr feine Mikrotomschnitte angewiesen sein, die uns ebenso wie bei der Bildung der ätherischen Öle in den Zellen, auch bei der Entstehung der Membranschleime u. a. Einblicke gestatten, die selbst mit den besten Freihandschnitten nicht zu erhalten sind. Und wenn man bei Niederschlägen Vergleiche über die Menge der betreffenden Substanz anstellen will, dann sind Schnitte von gleicher Dicke nötig, die eben nur das Mikrotom liefern kann.

Sehr verbreitet ist immer noch die Meinung, daß das Mikrotom sich bei Herbar- und Drogenmaterial nicht anwenden lasse. Wir besitzen indessen Mikrotome, die sich recht gut zum Schneiden harter Objekte eignen. Schon Koch und Raciborski haben über erfolgreiche Versuche berichtet.

Bei sehr harten Samen läßt man nach Koch[2]) vor dem Schneiden 1—2 Tropfen Wasser 1—2 Minuten lang auf die Schnittfläche einwirken. Kleine Samen werden

[1]) W. Lenz, Zur anatomischen Unterscheid. d. Früchte v. Illicium religiosum Sieb. und Illicium verum Hook. fil., Arch. d. Pharm., 1899, CCXXXVII, S. 241.

[2]) L. Koch, Mikrotechn. Mitteilungen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1896, XXIX, S. 39.

in japanisches Wachs oder (besser) in ein Gemisch von Paraffin und Sebum (1 : 1) eingebettet. Zerfallen die Präparate leicht beim Schneiden, dann hilft Bestreichen der Schnittfläche mit Kollodium, das sofort eintrocknet und nach 1/2 Minute das Abheben des Schnittes gestattet. Empfehlenswert ist das Imprägnieren harter Objekte mit Glyzeringummi. Die Objekte dürfen nicht mehr als 2 ccm Rauminhalt haben. Harte lebende Pflanzenteile werden vor dem Einbetten mit Alkohol abgetötet, mit dem man auch aus trockenen Hölzern u. a. die Luft entfernt. Der Alkohol ist stets durch Wasser zu verdrängen, worauf die Imprägnierung erfolgt. Hierzu wird die Dippelsche Einbettungsmasse[1]) benutzt (10 g Gummiarabikum, 10 g Wasser, 40—50 Tropfen Glyzerin und Zusatz von Karbolsäure als Antiseptikum). In diese Masse, die mit dem dreifachen Volumen Wasser verdünnt wird, gelangen die Stücke in einen offenen Behälter. Nach 6—8 Tagen hat die Masse durch Verdunstung Sirupkonsistenz angenommen. Die Stücke werden nun herausgenommen, vom anhaftenden Gummi möglichst befreit, zum weiteren Trocknen auf eine Glasplatte gestellt: am nächsten Tage wird durch Anschneiden die Schnittfläche hergestellt, und nach weiteren 3—4 Tagen können die Mikrotomschnitte hergestellt werden. Die Schnitte werden durch eintägiges Digerieren mit Wasser von 40—50° vom Gummi befreit. Auf diese Weise hat Koch von Pinus-Holz 1—2 qcm große Schnitte von 10—20 μ Dicke erhalten. — Schneller gelangt man zum Ziel, wenn man die Objekte in absoluten Alkohol bringt und aus diesem über Xylol die Einbettung in Paraffin-Sebum vornimmt.

Die Objekte von Herbarmaterial[2]) gelangen auf einige Stunden in Alkohol, auf 2—3 Stunden in Wasser, auf 24 Stunden in 50% Ammoniak bei 40°. Alsdann wird das Ammoniak mit Wasser ausgewaschen, dann folgt Alkohol, Toluol, Einbetten in Paraffin (s. weiter unten). Bei brüchigen Objekten wird der Paraffinblock vor jedem Schnitt mit einer dünnen Schicht leichtflüssigen Paraffins überzogen. Die Aufklebung erfolgt in der üblichen Weise mit Glyzerin-Eiweiß oder mit Wasser. Selbstverständlich muß bei der, mikrochemischen Untersuchungen dienenden Mikrotompräparation stets auf die Natur der zu prüfenden Substanzen geachtet werden. Ein Fixieren der Inhalte ist bei Herbar- und Drogenmaterial natürlich nicht mehr möglich, doch ist ein Härten oft dienlich (Schleim, Gummi).

Bei lebendem Material wird man im allgemeinen den von den Cytologen ausgearbeiteten Gang bei der Herstellung von Mikrotomschnitten benutzen. Dieser gliedert sich in Fixierung, Härtung (und Entwässerung) und Einbettung (in Paraffin, selten in Celloidin) des Materials, dann folgt Herstellung der Präparate mit dem Mikrotom, Aufkleben der Schnitte auf den Objektträger und Färbung der Schnitte (event. Verstärkung und Differenzierung der Färbung).

Die **Fixierung** hat die Aufgabe, die Strukturverhältnisse des lebenden Zustandes möglichst zu erhalten. Da aber durch die Fixierungsmittel Veränderungen unvermeidlich sind, so ist eine Kenntnis der Wirkung verschiedener Fixierungs-

---

[1]) L. Dippel, Handb. d. allg. Mikr., II. Aufl., S. 773.

[2]) M. Raciborski, Die Schutzvorrichtungen der Blütenknospen, Flora 1895, LXXXI, S. 151.

mittel, vor allem ein Vergleich mit lebendem Material unbedingt erforderlich, um Struktur und Kunstprodukte auseinanderhalten zu können (vergl. hierzu „Zellkern“). Ein gutes Fixierungsmittel muß sofort zur Wirkung gelangen und den Protoplasten möglichst rasch zum Erstarren bringen. Zu diesem Behufe muß es schnell und vollständig die Gewebe durchdringen. Größere Stücke und Pflanzen werden in kleinere zerlegt, schwer durchdringbare Häute und Gewebe (Kutikula, Kork) werden entfernt. Das Eindringen verschiedener Fixierungsmittel wird durch Anwendung von Wärme unterstützt und beschleunigt. Ein gutes Fixierungsmittel ist für verschiedene Fälle (Embryosack) kochender Alkohol; er hat vor anderen Mitteln den Vorzug, daß ein Auswaschen fortfällt (der Alkohol dient gleichzeitig zum Konservieren). Mit Alkohol fixierte Objekte bedürfen auch keiner Härtung. Weitere Fixierungsmittel sind: Jod, Chrom-, Essig-, Pikrin- und Osmiumsäure, Sublimat, Platinchlorid. Man wendet diese Mittel meist nicht für sich allein an, sondern sucht ihre Wirkung durch Kombination zu erhöhen. Die Zusammensetzung der gebräuchlichsten Mittel ist unter „Zellkern“ angeführt. Die Fixierung wird stets mit größeren Mengen der Fixierungsmittel vorgenommen. Die Dauer der Einwirkung ist je nach Objekt und Fixierungsmittel verschieden lange zu bemessen (von 1 Minute, Algen, bis mehrere Stunden, bei einigen sogar mehrere Tage). Besteht das Fixierungsmittel aus einer alkoholischen Lösung, so wird mit Alkohol ausgewaschen, in den übrigen Fällen meist in fließendem Wasser. Hierzu bedient man sich seit langem kleiner Siebeimerchen aus unglasiertem Porzellan[1]) (auch aus Platin), die mit den Objekten gefüllt und mit einem Kork verschlossen in eine geräumige Kristallisierschale unter die Wasserleitung gebracht werden. Der Wasserstrom wird in die Schale geleitet und letztere fast ganz mit einer Glasplatte bedeckt, so daß das überschüssige Wasser abfließen kann und das Herausspülen der Eimerchen verhindert wird. Eine einfache Wässerungseinrichtung, bei der für einen gleichmäßigen Wasserstrom gesorgt ist, hat Kowler[2]) angegeben. Der Apparat besteht aus einem U-förmigen Glasrohr; der eine Schenkel ist glatt und steht oben durch einen Gummischlauch mit der Wasserleitung in Verbindung. Der andere Schenkel ist in seiner Mitte kammerartig erweitert; sein oberes Ende ist verjüngt und nach unten gebogen (Ausflußstelle). Die Kammer selbst läßt sich in der Mitte auseinandernehmen (nimmt die Objekte auf) und dicht verschließen, da die Ränder geschliffen sind. An der Außenseite der Kammer angebrachte Federn halten die Hälften zusammen. Die Kammer ist nach oben und unten durch eingeschmolzene Glassiebe abgeschlossen (Apparat mit 50 ccm Kammerinhalt bei Otto Teschner, Jena, 3 M.). Auch die Vorrichtung von Suzuki läßt sich zum Auswaschen benutzen (s. weiter unten). Da das Auswaschen nicht nur in der Mikrotomtechnik, sondern auch bei mikrochemischen Arbeiten öfters notwendig ist, so sei noch die einfache Vorrichtung von Schaffnit[3])

[1]) D. G. Fairchild, A perforated porcelain cylinder as washing apparatur, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1895, XII, S. 301.

[2]) B. Kowler, Einfache Wässerungsvorrichtung für fixierte Objekte, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 259.

[3]) E. Schaffnit, Ein einfacher Auswaschapparat, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1901, XXVIII, S. 49.

erwähnt. Sie besteht in einfachster Form in einer Flasche, deren Boden abgesprengt ist. Die Flasche wird nach dem Einfüllen der Objekte unten mit Müllerseide überspannt, der Hals der Flasche durch einen Gummischlauch mit dem Hahn der Wasserleitung verbunden. „Zum Einfüllen von Wasser dreht man das frei schwebende Waschgefäß um, füllt es durch Aufdrehen des Hahnes zur Hälfte mit Wasser und kippt es dann wieder nach unten. Das Wasserniveau bleibt infolge des Luftdruckes konstant." Die Vorrichtung ist in Form eines Trichters mit umgeschlagenem Rande von Hugershoff-Leipzig zu beziehen.

Die **Härtung** (und Entwässerung), die der Fixierung folgt, ist bei den meisten Fixierungsmitteln, die nicht alkoholische Lösungen sind, unbedingt erforderlich, um die Objekte schnittfähig zu machen. Ganz allgemein benutzt man hierzu Alkohol. Bei Objekten, die mit wässerigen Lösungen fixiert wurden, besonders bei empfindlichen, bedarf die Entwässerung zur Vermeidung von Kollaps einiger Vorsicht. Hierzu ist eine ganze Anzahl von Apparaten im Gebrauch. Einige Entwässerungsapparate beruhen auf dem Prinzip der Dialyse (F. E. Schulze, Franchotte, Kolster), andere sind bestrebt, die zu entwässernden Objekte möglichst nahe dem Flüssigkeitsspiegel in einer spezifisch leichteren wasserärmeren Schicht zu lagern (Siebdosen von Steinach[1]), Suchanek, Porzellaneimer von Fairchild, Platinkörbchen von Schaffer) oder die Flüssigkeit in steter Bewegung zu halten (oberschlächtiges Wasserrad Thommas); der Greilsche Apparat[2]) gestaltet die Dialyse gleichmäßig und ermöglicht eine Regulierung derselben. Vielfach werden wir ohne Apparatur auskommen und die Stücke durch Umfüllen in allmählich konzentrierteren Alkohol überführen. Bei kleinen Algen u. a. können wir die Entwässerung mit Glyzerin vornehmen (S. 36) oder uns ein Schulzesches Entwässerungsgefäß[3]) in primitiver Weise herstellen, indem wir in ein weithalsiges, zum größeren Teile mit Alkohol gefülltes Gefäß einen unten mit Papier verklebten Zylinder einhängen, der die Objekte in stark verdünntem Alkohol enthält. Durch Osmose konzentriert sich der Alkohol des Zylinders langsam. Eine einfache und billige Vorrichtung hat Suzuki[4]) empfohlen. Sie

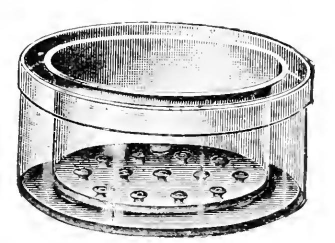


Fig. 11. Glassiebchen nach Steinach, aus der Preisliste von Grübler & Co., Leipzig.

[1]) E. Steinach, Siebdosen, eine Vorrichtung zur Behandlung mikroskopischer Präparate, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1888, IV, S. 433; bei Grübler-Leipzig, Glassieb und Glasdose 2 M., 1 Garnitur (Sieb mit 3 Dosen) 3,50 M. (Fig. 11).

[2]) A. Greil, Ein neuer Entwässerungsapparat, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1906, XXIII, S. 286.

[3]) F. E. Schulze, Ein Entwässerungsapparat, Arch. f. mikr. Anatomie, XXVI, S. 539. Dieser Apparat hat 2 Einsatzzylinder. Ver. Fabr. f. Labor. Bed., Berlin N, führen den Apparat für 2,50 M., ferner Osmosepapier, dünn 1 m = 0,60, stark 1,00 M. (Fig. 12, s. S. 44).

[4]) B. Suzuki, Eine einfache Entwässerungs-, Härtungs- und zugleich Auswaschvorrichtung für mikrotechnische Zwecke, Ztschr. f. wiss Mikr., 1909, XXVI, S. 211.

besteht im wesentlichen aus 2 U-förmig miteinander verbundenen Zylindern. Die beiden Schenkel (Zylinder, Zu- und Ablaufgefäße) fassen je 80—100 ccm Inhalt (3 cm weit, 9 cm hoch), das verbindende Knie ist enger und wird mit Watte verstopft. Der Ablaufschenkel, in dem die zu entwässernden Objekte zu liegen kommen, hat oben einen Abflußhahn, welcher zu einer tiefer stehenden Flasche führt, die das Ablaufende auffängt. Auf den Zulaufschenkel kommt ein umgekehrter, die Flüssigkeit enthaltender Glaskolben, durch dessen Stöpsel 2 Glasröhren führen, wie es bei einem Wasserbade mit konstantem Niveau der Fall ist. Zu- und Ablauf kann leicht reguliert werden. Die auf die eine oder andere Art in konzentrierteren Alkohol überführten Objekte gelangen schließlich auf einen bis mehrere Tage in absoluten Alkohol.

Die **Einbettung** kann in allen Fällen in Paraffin vorgenommen werden (bei Drogen in Paraffin-Talg). Zuvor passieren die Objekte Chloroform-Paraffin oder Xylol und Xylol-Paraffin (auch Toluol, Benzol, Terpentinöl werden zur Passage benutzt). Die Objekte kommen daher aus dem absoluten Alkohol zunächst in ein Gemisch von Chloroform-Alkohol (1 + 1) oder Xylol-Alkohol (2 + 1) und nach 24 Stunden (oder länger) in reines Chloroform resp. Xylol, worin sie ebenso lange verweilen. Nach völliger Durchtränkung wird die überschüssige Flüssigkeit abgegossen und der Rest der Flüssigkeit nebst den Objekten in kleine Schälchen übergeführt, die man in den Thermostaten bei 20—30° bringt. Dort setzt man der Flüssigkeit nach und nach kleine Mengen von Paraffin zu. So kommen die Objekte schließlich in fast reines Paraffin zu liegen, denn einerseits verdunstet das Chloroform (resp. Xylol), anderseits vermehren wir durch Zusatz den Paraffingehalt. Nun erst erfolgt die Überführung in reines Paraffin. Der Schmelzpunkt des Paraffins zum Schneiden mit quergestelltem Messer soll 60°, der des Paraffins zum Schneiden mit schräggestelltem Messer 57—58° betragen[1]). Es ist vorteilhaft, das durch Erwärmen flüssig gemachte Paraffin und die paraffindurchtränkten Objekte in entsprechender Anordnung in Uhrgläschen einzutragen. Waren die Uhrgläschen zuvor mit Glyzerin eingerieben, dann läßt sich die erstarrte Paraffinmasse leicht herausheben. Das Erstarren des Paraffins wird beschleunigt, indem man die beschickten Uhrgläser auf Wasser schwimmen läßt und nach oberflächlichem Erstarren ins Wasser untertaucht. Das Untertauchen im Wasser ist nötig, damit im Paraffin keine Hohlräume entstehen. Hingegen ist die verschiedentlich empfohlene Kühlung des Wassers durch Eis nicht erforderlich, zuweilen sogar schädlich (Carazzi)[2]). Aus dem erstarrten Paraffinblock werden die Objekte in kleinen Würfelchen herausgeschnitten, die man mit einer heißen Nadel auf Blöcke von Paraffin aufschmilzt,

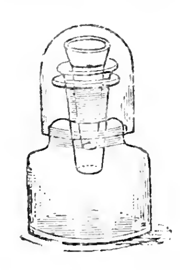


Fig. 12. Entwässerungsapparat. Ver. Fabr. f. Laborat.-Bedarf, Berlin N.

[1]) Diese Paraffine liefern Grübler-Leipzig u. a. zum Preise von 2,50 M. das Kilo.

[2]) D. Carazzi, Über die Abkühlung des Paraffins, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 530.

welche in die Klammer der Objekthalter passen[1]). Auch Metallwinkel sind als Paraffineinbettungsrahmen vielfach im Gebrauch (Fig. 13).

Über das **Schneiden** mit dem Mikrotom lassen sich allgemein gültige Anweisungen nicht geben. Die Schnittfähigkeit des Materials, die Stärke und Größe der gewünschten Schnitte bedingen vielfache Modifikationen, die nur die Praxis zu lehren vermag. Jedem Mikrotom liegen ausfürliche Gebrauchsanweisungen bei. Es ist jedoch vorteilhafter, sich erst in einem botanischen Institute die nötigen Fähigkeiten anzueignen und sich dann erst das zusagende Instrument zu beschaffen. Besonderes Gewicht ist auf die Schärfe des Messers zu legen. Zum Schleifen der Mikrotommesser sind Messerhalter erforderlich. Eine recht brauchbare Anleitung zum Schleifen der Messer gab Ssobolew[2]). Übrigens wird das Schleifen der Messer jetzt auch von den Mikrotomfabrikanten (Jung, Heidelberg) besorgt.

Das **Aufkleben** (Befestigen) der Paraffinschnitte auf den Objektträgern kann in verschiedener Weise ausgeführt werden: Mit Wasser durch Kapillarattraktion nach Gulland[3]). Die Schnitte werden auf warmes, in einem flachen Gefäße befindliches Wasser geworfen. Die Temperatur des Wassers darf nicht so hoch sein, daß das Paraffin zum Schmelzen kommt. Die Schnitte breiten sich aus und werden mit einem Objektträger[4]) herausgehoben. Man läßt das Wasser abfließen und läßt die Objektträger vor Staub geschützt bei mäßiger Wärme (50°) 1—5 Stunden (je nach der Dicke der Schnitte) liegen. Nun wird durch Erwärmen das Paraffin geschmolzen und mit Xylol (oder Terpentin) entfernt; die Schnitte bleiben auf dem Objektträger haften. Nach Heidenhain[5]) ist

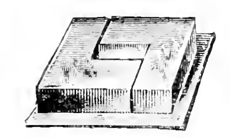


Fig. 13. Paraffineinbettungsrahmen aus Metallwinkeln (Preis 3 M.) aus der Preisliste von Grübler & Co., Leipzig.

[1]) Über die Einbettung in Celloidin, die bei pflanzlichen Objekten nur selten benutzt wird, sind die Publikationen von Schiefferdecker, Apáthi, W. Busse in der Ztschr. f. wiss. Mikr. einzusehen. Über das Verhalten von Celloidinschnitten s. D. Carazzi, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 533 u. a.

[2]) L. W. Ssobolew, Theorie und Praxis des Schleifens, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 65; die Anleitung bezieht sich auch auf das Schleifen der Rasiermesser; vergl. ferner: J. Lendvai, Apparat zum Schleifen des Mikrotommessers, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 203.

[3]) H. L. Gulland, A simple method of fixing paraffin sections to the slide, Journ. of Anat. and Physiol., 1891, XXVI, S. 56—58.

[4]) Die Objektträger werden mit Kaliseife durch Reiben zwischen beiden Handflächen gereinigt und nach gründlichem Abspülen der Seife mit Wasser sofort benutzt (ohne abgetrocknet zu werden). Vergl. J. F. Gudernatsch, Zur Technik der Wasseraufklebung von Paraffinschnitten, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1907, XXIV, S. 357. Die Objektträger müssen nämlich völlig entfettet sein, damit das Wasser sich gleichmäßig verteilt. Andere reinigen die Gläser durch 2—3wöchentliche Behandlung mit Kaliumdichromat-Schwefelsäure, dann Abwaschen mit Wasser, schließlich folgt Alkohol.

[5]) M. Heidenhain, Über Kern und Protoplasma, Koelliker Festschrift, Leipzig 1892, S. 109.

die Methode gut bei Alkohol- und Sublimatpräparaten, unsicher, wenn zur Fixierung Chromsäure- oder Osmiumsäuregemische benutzt wurden. Bei der Befestigung mit Eiweiß-Glyzerin[1]) wird eine filtrierte Lösung von gleichen Teilen Eiweiß und Glyzerin benutzt. Nach Reinke[2]) wird die Filtration durch wenig Thymolzusatz beschleunigt. Thymol macht die Lösung ebenso wie Kampherstückchen für einige Wochen haltbar. Eine Spur dieser Mischung wird mit dem Finger auf dem Objektträger fein verrieben, dann werden die Schnitte aufgelegt und mit dem trocknen Finger angedrückt. Nun werden die Objektträger erwärmt und das Paraffin mit Xylol oder Terpentin entfernt. Reinke (a. a. O.) bringt auf die mit Eiweiß-Glyzerin eingeriebenen Objektträger reichlich destilliertes Wasser, legt dann die Präparate auf, erwärmt gelinde (das Paraffin darf hierbei nicht schmelzen), bis sich die Schnitte geglättet haben, saugt das überschüssige Wasser ab und läßt die Präparate bei 30—35° eintrocknen.

Färbung: Die aufgeklebten Schnitte werden fast stets gefärbt. Vor der Färbung muß das Paraffin mit Terpentinöl, dann mit absolutem Alkohol aus den Schnitten enfernt werden. Stückfärbung der Objekte vor dem Einbetten in Paraffin wird nur selten geübt. Meist führt man Doppelfärbungen aus und läßt Farbstoffgemische oder mehrere Farben nacheinander einwirken. Beizen sind nur bei den adjektiven (indirekten) Färbungen erforderlich, nicht bei den substantiven (direkten). Die meisten Fixierungsmittel wirken als Beizen (Alaun). Bei der Wahl der Farblösung ist die Natur des Fixierungsmittels zu berücksichtigen. Die Farbstoffe sind nur aus zuverlässiger Quelle zu beziehen, Teerfarben von Grübler-Leipzig, Kahlbaum-Berlin, Merck-Darmstadt, von den Höchster und Elberfelder Farbenfabriken u. a. Bei Benutzung nicht eingeführter Teerfarben muß stets die Bezugsquelle angegeben werden, da selbst die Präparate der genannten Firmen nicht immer miteinander übereinstimmen. In solchen Fällen ist die Angabe orientierender makrochemischer Versuche über die Natur des Farbstoffes erforderlich. Fabrikate vergangener Jahrzehnte, welche sich öfters in den Institutssammlungen finden, sollten von der Benutzung ausgeschlossen werden; gar zu oft ist ein derartiges Produkt im Handel nicht mehr zu haben. Bei Erprobung neuer Farbstoffkombinationen wende man sich an Dr. R. Hollborn-Leipzig, Kronprinzenstr. (Grübler & Co.), der stets gern Auskunft erteilt.

Die Konzentration und die Zusammensetzung der Farblösung läßt sich nur von Fall zu Fall entscheiden, ebenso die Dauer der Einwirkung. Vorteilhaft wird zuweilen überfärbt und der überschüssige Farbstoff ausgewaschen. Auch über die Dauer des Auswaschens und über die Wahl der Waschflüssigkeit läßt sich kein allgemein gültiges Gesetz aufstellen. Die Färbungen erfahren oft eine Nachbehandlung zur Erzielung besserer Bilder mit Säurefuchsin, Säurealkohol u. dergl., sie werden differenziert.

Zur gleichzeitigen Färbung einer größeren Anzahl aufgeklebter Präparate benutzt man jetzt allgemein nach dem Vorschlage von Caro[3]) Glaströge von an-

---

[1]) P. Mayer, Mitteil. d. Zool. Station zu Neapel, 1883, IV, S. 521.

[2]) F. Reinke, Die japanische Methode zum Aufkleben von Paraffinschnitten, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1895, XII, S. 21—23.

[3]) Caro, Eine einfache Methode zur gemeinsamen Behandlung von aufgeklebten Serien- und Kurspräparaten, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1895, XII, S. 19.

nähernder Höhe der Objektträger. Diese werden zu $^2/_3$ mit der Farblösung gefüllt und erhalten einen Deckel aus steifer Pappe, in dem Schlitze geschnitten sind, die etwa je 0,5 cm voneinander entfernt sind und durch die je 2 mit der Rückseite aufeinander gelegte Objektträger durchgeschoben werden können. Diese paarweis zusammengelegten Objektträger werden oben durch kleine Gummiringe (0,3 cm lange, aus einem fingerdicken Gummischlauch geschnittene Stücke) zusammengehalten, wodurch auch ein Durchrutschen der Objektträger durch die Öffnungen verhindert wird. Die Objektträger sind wie bei einer Tauchbatterie angeordnet[1]). Den gleichen Zweck erfüllt in sehr einfacher Weise nach Funck[2]) ein dem Boden eines geeigneten Glashafens aufliegender vernickelter Rahmen. Nickeldraht wird in Schlangenlinien, die rechtwinklig verlaufen, gebogen. Die Winkel dienen als Stützpunkt für die senkrecht eingestellten Objektträger, die mit ihren oberen Enden aus der Flüssigkeit herausragen und einander aufliegen können. In der Mitte, wo sich die Präparate befinden, sind sie genügend weit voneinander entfernt. Diese Vorrichtungen dienen natürlich ebenfalls zur Passage (verd. Alkohol, absoluter Alkohol, Xylol-Alkohol, Xylol) aufgeklebter Schnitte.

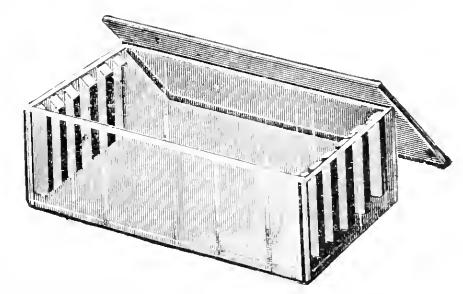


Fig. 14. Färbekasten (Preisliste, Grübler & Co., Leipzig).

Nach erfolgter Färbung erfahren die Schnitte eine Aufhellung. Dies geschieht gewöhnlich in Xylol-Kanadabalsam nach vorheriger Passage von Alkohol, Nelkenöl und Xylol.

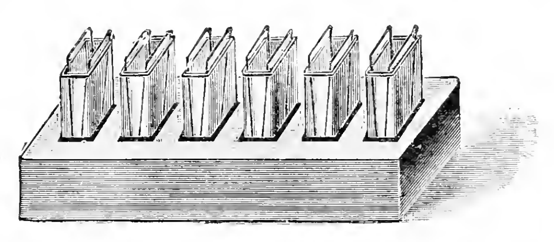


Fig. 15. Färbekasten im Holzblock (Grübler & Co., Leipzig).

Optisches.

Das polarisierte Licht ist in der Mikrochemie ein vorzügliches Hilfsmittel. Es dient nicht nur zur näheren Bestimmung von Kristallen, zur Auffindung sehr feiner kristallinischer Niederschläge, die im gewöhnlichen Licht kaum zu erkennen sind, sondern es leistet wertvolle diagnostische Dienste bei organisierten Zellbestandteilen, bei Membranen,

---

[1]) Praktisch sind ferner die Färbekästen aus Glas (bei Grübler-Leipzig zu 1,25 M. für 10 Objektträger, Fig. 14); auch gibt es Holzblöcke, in denen rechteckige Glaskästen von Objektträgerhöhe stehen (4,50 M., Fig. 15).

[2]) Ch. Funck, A propos de la déshydratation des coupes montées sur lames porte-object, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 422.

bei der Stärke, selbst bei Schleimen. Ein eigenes Polarisationsmikroskop wird nur selten zur Verfügung stehen, meist wird der Polarisationsapparat dem Arbeitsmikroskop bei Bedarf angefügt. Derartige Polarisationsapparate (im Preise von 45—60 M.) bestehen aus zwei Nicolschen Prismen, dem Polarisator (Fig. 16) und dem Analysator (Fig. 17). Der erstere wird in die Schiebehülse des Diaphragmenhalters eingeschoben (an Stelle des Beleuchtungsapparates), dieser Nicol befindet sich unterhalb des Objektes. Der Analysator, der den zweiten Nicol enthält, wird über dem Objekt, gewöhnlich dem Okular aufgesetzt und besitzt ein Fadenkreuz und ev. einen Teilkreis zum Messen der Drehung der Polarisationsebene. Dreht man nun den Analysator um die Achse des Instrumentes, während man das aufgelegte Präparat beobachtet (Zellmembran und Kristalle), so wird man finden, daß die Helligkeit des Bildes wechselt. Wenn das Gesichtsfeld am dunkelsten ist (ganz schwarz), stehen die beiden Nicols gekreuzt, wenn es am hellsten ist, parallel.

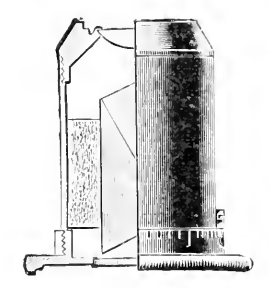


Fig. 16. Polarisator des Polarisationsapparates von W. u. H. Seibert, Wetzlar.

Bei gekreuzten Nicols (im polarisierten Lichte) können zwei Fälle eintreten. Entweder bleiben alle Gegenstände des Präparates, auch beim Drehen des Präparates, stets dunkel. Membranen, Kristalle und andere Körper, die dieses Verhalten zeigen, bezeichnen wir als einfachbrechend (isotrop). Hierher zählen amorphe Substanzen und die Kristalle des regulären Systems. Körper, die aufleuchten, wie Stärke, die meisten Kristalle und Membranen und manche Schleime werden doppelbrechend (anisotrop) genannt. Lassen wir die beiden Nicols in gekreuzter Stellung und drehen wir das Objekt, resp. einen Kristall vollständig um seine Achse, indem wir den Objekttisch langsam drehen, so können wir die optischen Achsen ermitteln. Wir nennen einen Kristall optisch einachsig, wenn er nur in einer einzigen Richtung nicht aufhellt (Kristalle des hexagonalen und tetragonalen Systems), optisch zweiachsig, wenn er in zwei Richtungen nicht aufhellt (rhombisches, mono- und triklines System). Wie man sieht, kann man derart leicht wichtige Anhaltspunkte für die kristallographische Bestimmung der Kristalle erhalten. Von einer eingehenden Bestimmung wird man meist absehen müssen, denn die bei den pflanzlichen Objekten erhaltenen Niederschläge führen relativ selten so gut ausgebildete Kristalle, daß ihre Bestimmung möglich ist, ganz abgesehen davon, daß die genaue kristallographische Bestimmung eine spezielle Ausbildung verlangt. In den meisten Fällen wird man sich mit der Angabe der Auslöschungsrichtung und des Verhaltens der Kristalle gegenüber den Gipsplättchen begnügen.

Die Richtungen, in denen ein Kristall nicht aufhellt, in denen er sich wie ein einfachbrechender verhält, werden seine Auslöschungsrichtungen genannt. Verläuft die Auslöschungsrichtung der Hauptkante des Kristalles parallel, so spricht man von einer geraden Auslöschung, die vorzüglich den Kristallnadeln zukommt. Bildet die Auslöschungsrichtung mit der Hauptkante einen Winkel, dann löscht der Kristall schief aus und der Winkel wird als Auslöschungsschiefe bezeichnet. Zu seiner Bestimmung ist natürlich ein feinerer Teilkreis am Analysator erforderlich.

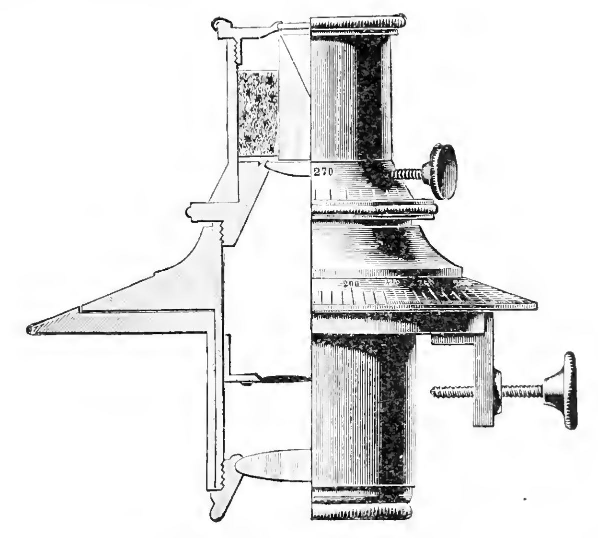


Fig. 17. Analysator des großen Polarisationsapparates von W. u. H. Seibert, Wetzlar.

Eine für unsere Zwecke ausreichende Anleitung für die Ermittelung des Kristallsystems findet sich bei Fuchs-Braun (Anleitung zum Bestimmen der Mineralien, Gießen 1907, S. 71):

„I. Alle Kristalle bleiben bei gekreuzten Nicols in jeder Lage dunkel; sie sind einfach brechend, regulär (Caesiumalaun).

II. Die meisten Kristalle werden zwischen gekreuzten Nicols hell (oft nur grau) und farbig und besitzen gerade Auslöschung, einzelne bleiben in allen Lagen dunkel; sie sind doppelbrechend und optisch einachsig. Man hat weiter den Umriß der dunkel bleibenden Kristalle zu beachten:

a) der Umriß der dunkel bleibenden Kristalle ist vierseitig (oder achtseitig), quadratisch, die Kristalle sind quadratisch [tetragonal] (Kalziumoxalat);

b) der Umriß ist sechsseitig, die Kristalle sind hexagonal (Kieselfluornatrium);

c) der Umriß der dunkel bleibenden Kristalle ist dreiseitig; die Kristalle sind rhomboedrisch (Natronsalpeter).

III. Alle Kristalle werden zwischen gekreuzten Nicols hell (oft nur grau) und farbig, sie sind optisch zweiachsig:
 a) alle besitzen gerade Auslöschung, sie sind rhombisch (Chlorblei);
 b) die meisten besitzen schiefe, einige gerade Auslöschung, sie sind monoklin (Gips);
 c) alle Kristalle zeigen schiefe Auslöschung, sie sind triklin (Kupfervitriol)."

Mit Hilfe von Gipsplättchen werden die Additions- und Subtraktionsfarben der doppelbrechenden Kristalle bestimmt. Die Gipsplättchen werden dem Polarisationsmikroskop in verschiedener Weise eingeschaltet, teils unmittelbar über dem Objektiv, teils auf dem Okular unter Analysator. Sie sind derart beschaffen, daß sie bei gekreuzten Nicols das Violett erster Ordnung zeigen. Betrachten wir doppelbrechende Kristalle bei eingelegtem Gipsplättchen, dann geht das Violett des Plättchens in andere Farben über; Kristall und Gipsplättchen wirken entweder gleichsinnig, es resultieren Additionsfarben oder entgegengesetzt, es entstehen Subtraktionsfarben. Viele Kristalle erscheinen bekanntlich im polarisierten Lichte silbergrau, dann ist bei eingeschaltetem Gipsplättchen Blau die Additions- und Gelb die Subtraktionsfarbe. Von den Membranen zeigen die kutinisierten Subtraktions-, die zellulosehaltigen Additionsfarben. Bei den Stärkekörnern erscheinen die Arme des Kreuzes in der Farbe des Gesichtsfeldes (bei Benutzung des Plättchens Rot I) rot oder grün. Die zwischen den Armen des Kreuzes liegenden Teile des Kornes zeigen abwechselnd Additions- und Subtraktionsfarben.

Über das Verhalten der Zellbestandteile und der bei den Reaktionen erhaltenen Niederschläge bei gekreuzten Nicols finden sich Angaben im speziellen Teil. Vielfach stehen noch Angaben aus und das polarisierte Licht könnte noch weitere Anwendung finden[1]. Zur Diagnose von Pflanzenfasern wurde es von Schacht[2] bereits empfohlen. Lenz[3] studierte das Verhalten der Jute-, Leinen- und Hanffaser. Eingehend beschäftigte sich Behrens[4] mit der „spezifischen Doppelbrechung", sowie Remec[5]. Grundlegend sind die Arbeiten von Ambronn. In der Baumwollfaser fällt die Längsachse der Elastizitätsellipse nicht in

[1] Über das Polarisationsmikroskop geben die Bücher von Ambronn (Leipzig 1892) und Weinschenk (Freiburg i. B. 1910) eingehende Aufklärung.

[2] Schacht, Anat. u. Phys. d. Gew., 1856, 1, S. 430.

[3] W. Lenz, Unterscheidung von Hanf und Flachs, Zeitschr. f. analyt. Chem., 1890, XXIX, S. 133.

[4] W. Behrens, Anleitung zur mikroch. Analyse, 1896, 2. Heft, S. 3.

[5] B. Remec, Über die spezifische Doppelbrechung der Pflanzenfasern, Sitzber. Wien. Akad., 1901, CX, 1. Abt., S. 364.

die Richtung der Faserlängsachse, sondern bildet mit ihr verschieden große Winkel. Herzog[1]) empfiehlt, vor der Untersuchung Aufkochen der Fasern unter Deckglas in konz. Chloralhydratlösung. Lignin hat auf die Doppelbrechung keinen Einfluß. Fettartige Einlagerungen setzen den Grad der Doppelbrechung herab, der infolge von Organisationseigentümlichkeiten selbst bei gleicher Dicke und gleicher chemischen Beschaffenheit der Membran verschieden sein kann. Selbst jugendliche Zellmembranen sind anisotrop. Mit Hilfe des polarisierten Lichtes kann man Kork (s. d.) von Zellulose unterscheiden. Bei der Untersuchung von Nahrungs- und Genußmitteln ist eine ausgedehntere Benutzung des polarisierten Lichtes nur zu empfehlen, so weist man, um an dieser Stelle nur ein Beispiel aus neuerer Zeit anzuführen, Oliventrester noch bei Zusatz von weniger als 5 % im Pfefferpulver leicht mit Hilfe des polarisierten Lichtes nach. Das Pulver wird mit einer 1 %igen salzsauren Lösung von Paraphenylendiamin befeuchtet und das Präparat nach 1/4 Stunde bei gekreuzten Nicols untersucht. Die Trester treten sehr scharf gelbrot leuchtend hervor[2]).

Bestimmung der Brechungsexponenten. Von den Mineralogen wird seit etwa 30 Jahren (seit Thoulet, Bull. Soc. min. France, 1880, III, S. 62) zur Identifizierung von Mineralien als Konstante der Brechungsindex herangezogen. Die Methoden beruhen auf der Beobachtung der Lichterscheinungen an der Grenze zweier Körper von verschiedenen Brechungsexponenten. Der eine Körper ist eine Flüssigkeit von bekanntem Brechungsindex; in diese Flüssigkeit wird der feste Körper, dessen Brechungsindex bestimmt werden soll, eingebettet. Hierauf fußen die Einbettungsmethoden von Schroeder van der Kolk[3]) und von Kley[4]). Zur Ausführung ist eine größere Anzahl von Flüssigkeiten von bekannten Brechungsindices nötig. Diese Flüssigkeiten hat man in eine Reihe geordnet, und so gewählt, daß zwei benachbarte Glieder der Reihe zur Erzielung von Zwischenwerten miteinander mischbar sind. Die Werte der einzelnen Glieder differieren durchschnittlich um 0,02. Natürlich dürfen sich die zu prüfenden Kristalle in den Flüssigkeiten nicht zu schnell lösen. Ist dies der Fall (besonders wenn nur sehr kleine und winzige Kristalle vorliegen), dann

[1]) A. Herzog, Zur Kenntnis der Doppelbrechung der Baumwollfaser, Ztschr. f. chem. Kolloid., 1909, V, S. 246.

[2]) V. Garola und V. Brain, Recherche du Grignon d' Olive dans le Poivre, Ann. d. Falsificat., 1911, IV, S. 467.

[3]) Schroeder van der Kolk, Tabellen zur mikr. Bestimmung der Mineralien nach ihrem Brechungsindex, Wiesbaden 1900, II. Auflage 1905 von Beekmann bearbeitet.

[4]) P. D. C. Kley, Rec. d. travaux chim. des Pays-Bas, 1903, XXV, S. 367.

muß man wie Kerbosch[1]) verfahren und die betreffenden Flüssigkeiten zuvor mit der betreffenden Substanz sättigen, hat dann allerdings von den gesättigten Flüssigkeiten die Brechungsexponenten mittels Refraktometers festzustellen[2]).

Man legt nun einige Fragmente oder Kristalle (reguläre) des zu prüfenden Körpers auf den Objektträger in einen Tropfen einer Flüssigkeit mit mittlerem Brechungsexponenten. Mit Hilfe der Beckeschen Linie[3]) läßt sich feststellen, ob die Substanz stärker oder schwächer bricht als die Flüssigkeit, indem man bei möglichst enger Blendenöffnung auf eine Kante des Körpers scharf einstellt, und während der Beobachtung den Tubus hebt: eine feine, helle Lichtlinie schreitet nun parallel mit der Kante gegen den stärker lichtbrechenden Körper hin fort. Bricht der Körper stärker, dann liegt der Lichtschein gewissermaßen auf dem Körper, bricht er schwächer, dann ist der Körper mit einem Lichtschein gewissermaßen umhüllt, welcher beim Heben des Tubus von dem Körper abwandert. Hat man festgestellt, ob der Körper stärker oder schwächer bricht als eine bestimmte Flüssigkeit, dann wiederholt man den Versuch mit einer anderen Flüssigkeit, wählt aber nicht die mit dem nächst höheren, resp. niederen Index, sondern überspringt einige Glieder der Reihe, um zu Grenzwerten (Grenzflüssigkeiten) zu gelangen. Zwischen diesen operiert man weiter, mischt ev. die benachbarten in Betracht kommenden Flüssigkeiten. Solange die Indices von Körper und Flüssigkeit nicht übereinstimmen, ist die Beckesche Linie gut wahrzunehmen; auch wenn die Indices nur wenig verschieden sind, treten Farbenerscheinungen an dem Rand des Kristalles auf, welche auf der verschiedenen Dispersion von Kristall und Flüssigkeit beruhen und ein schnelles Arbeiten erleichtern. Bei der Beobachtung werden alle Linsen zwischen Spiegel und Objekt ausgeschaltet; es wird mit dem Planspiegel (im parallelen Licht) gearbeitet.

Doppelbrechende Kristalle, denen ein verschiedener Index zukommt, werden in einen Tropfen Flüssigkeit eingebettet, in eine Auslöschungsrichtung zwischen gekreuzten Nicols gebracht. Dann wird der

---

[1]) J. M. Kerbosch, Bildung und Verbreitung einiger Alkaloide in Papaver somniferum L., Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 536.

[2]) Die Serie Einbettungsflüssigkeiten mit Indices von 1,46—1,93 nach v. d. Kolk ist bei F. Krantz-Bonn käuflich zu erhalten; ihre Anschaffung ist zu empfehlen, da die Refraktometer kostspielig sind. Doch hat E. Clerici eine Methode ausgearbeitet, um den Brechungsexponent einer Flüssigkeit mit dem Mikroskop bestimmen zu können, die es also gestattet, die Bestimmung des Index von Kristall und Flüssigkeit zu kombinieren (Rendiconti R. Ac. Lincei Roma 1907, XVI, S. 336).

[3]) Becke, Sitzber. Wien. Akad., 1893, CII, S. 358.

obere Nicol entfernt und der Brechungsindex bestimmt. Nun dreht man den Objekttisch um 90° und stellt den Index in der anderen Auslöschungsrichtung fest. Die Versuche werden mit anderen Flüssigkeiten weitergeführt. Kristallographisch richtig ist die Methode, wie Kley betont, bei optisch einachsigen Kristallen, bei optisch zweiachsigen hat man eigentlich drei Indices zu bestimmen; meist, wie bei den Alkaloiden, genügt die Bestimmung von zwei Indices.

Im folgenden sind nach Kolk die Brechungsindices der hauptsächlich in Betracht kommenden Flüssigkeiten angegeben:

I. Hexan 1,37, Heptan 1,39, Cajeputöl 1,46, Olivenöl 1,47, Rizinusöl 1,49, Benzol, Xylol, Buchenkernöl 1,50, Zedernöl 1,51, Nelkenöl 1,53, Anisöl 1,56, Bittermandelöl 1,60, Schwefelkohlenstoff 1,63, α-Monobromnaphthalin 1,66, Methylenjodid 1,76, Phenylsulfid 1,95. — II. Methylalkohol 1,32, Wasser 1,34, Äthyläther 1,36, Äthylalkohol 1,37, Amylalkohol 1,40, Chloroform 1,45, Glyzerin 1,47, Kreosot 1,54, Anilin 1,60, Cadmiumborowolframat 1,70, Kaliumquecksilberjodid 1,72, Barynmquecksilberjodid 1,79, Lösung von Quecksilberjodid in Anilin und Chinolin 2,20. — Weiteres muß in der angeführten Literatur ersehen werden.

Das **Ultramikroskop**, mit dem man bekanntlich die Homogenität eines Mediums feststellt, ist auf unserem Gebiete noch nicht in genügender Weise erprobt worden. Überdies steht es nicht jedem zur Verfügung, so daß wir von einem Eingehen absehen können. Die Erfahrungen Gaidukows[1]) sind bei den betreffenden Objekten mitgeteilt. Bei der Prüfung gefärbter Gespinnste und bedruckter Erzeugnisse der Textilindustrie hat es sich bewährt. Die nach verschiedenen Verfahren gefärbten Fasern lassen im ultramikroskopischen Lichte verschiedene Merkmale erkennen. Färbungen mit unlöslichen und adjektiven Farbstoffen sind gut von direkten Färbungen zu unterscheiden[2]). Die Membranen lebender in einem optisch leeren Substrat liegender Bakterien treten im Dunkelfelde klar hervor und heben sich scharf vom Inhalte ab. Die Inhalte überstrahlen teils die Membran (wenn sie stark leuchten, Fette, Volutin), teils grenzen sie sich nur unvollständig von der Membran ab (wenn sie schwach leuchten, Glykogen)[3]).

Tswett[4]) hat bei botanischen Untersuchungen ein von ihm konstruiertes „Luminoskop" benutzt und in neuerer Zeit bei Chlorophyll- und Cyanophyll-Studien das Fluoreszenz-Mikroskop von C. Reichert, Wien angewandt. Fast alle Stoffe können zur Fluoreszenz erregt werden, zu den wenigen Ausnahmen zählen die roten Blutkörperchen, Porzellan u. a. Dem Fluoreszenzmikroskop steht

[1]) N. Gaidukow, Dunkelfeldbeleuchtung u. Ultramikroskopie in d. Biologie u. Medizin, Jena, 1910.

[2]) J. Schneider u. G. Künzl, Spinnfasern und Färbungen im Ultramikroskope, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1906, XXIII, S. 393.

[3]) A. Meyer, Notiz über das Aussehen der Bakterien im Ultramikroskop, Arch. f. Protistk., 1911, XXIV, S. 76.

[4]) M. Twsett, Zeitschr. f. phys. Chem., 1901, XXXVI, S. 450; Ber. deutsch. bot. Ges., 1911, XXIX, S. 744 und: O. Heimstädt, Das Fluereszenzmikroskop, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1911, XXVIII, S. 330.

ein weites Arbeitsfeld offen, auch für angewandte Zwecke. Sehr geringe Beimengungen von Mutterkorn im Mehl lassen sich ohne Schwierigkeit feststellen, denn Stärke fluoresziert dunkelviolett, Mutterkorn gelblichweiß.

Auf die Spektralanalyse ist in diesem Buche nicht eingegangen.

Zählen, Messen, Wiegen.

Das Absuchen der Präparate wird durch Suchtische erleichtert, die gleichzeitig ein sicheres Zählen von Kristallen u. dergl. ermöglichen. Mit den Suchtischen lassen sich bei Heranziehung von Kontrollmischungen auch quantitative mikroskopische Analysen von Nahrungs-, Genuß- und Futtermitteln ausführen[1]. Schon der kleine Suchtisch für 36 M. nach A. Meyer wird meist genügen (Seibert-Wetzlar). Größeren Ansprüchen genügen der Engelsche Tisch (Leitz-Wetzlar), der Perquirator nach A. Meyer (100 M., Seibert-Wetzlar) und die Fabrikate anderer Firmen, die in den Preislisten sowie auch meist in der Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie[2]) eingehend geschildert sind.

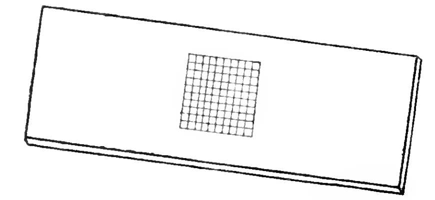


Fig. 18. Objektträger zum Absuchen (nach O. Linde).

In Ermangelung der Suchtische lassen sich Deckgläser und Objektträger verwenden, die in kleine Quadrate eingeteilt sind. Hansen[3]) hat schon 1884 zur Erleichterung der Zählung den inneren Teil eines Deckglases mit kleinen Quadraten eingeritzt. Linde[4]) folgt ihm im Prinzip, wenn er auf dem Objektträger ein Quadrat von 15 mm Seitenlänge einätzt. Das große Quadrat wird durch je neun auf jeder Seite eingeätzte Linien in 100 kleine Quadrate gefeldert. Die eingeätzten Linien werden mit Eisenchlorid und Ferrozyankalium blau gefärbt. Die Blaufärbung der Linien läßt sich daher bei längerem Gebrauch leicht auffrischen, ist aber für mikrochemisches Arbeiten nicht zweck-

---

[1]) Hierüber näheres bei A. Meyer, Der Artikel Flores Koso d. Arzneib. und eine Methode der quant. mikr. Analyse. Arch. d. Pharm., 1908, CCXLVI, S. 523, u. Grundlagen u. Methoden f. d. mikr. Unters. v. Pflanzenpulvern, sowie bei G. Bredemann, Die quantitative mikroskopische Bestimmung der Brandsporen (Tilletia-Sporen) in Mehl, Kleie und Getreide, Landw. Versuchsstat., 1911, LXXV, S. 135.

[2]) 1906, XXIII, S. 145, 1908, XXV, S. 60, 1909, XXVI, S. 80 u. a.

[3]) E. Chr. Hansen, Über das Zählen mikroskopischer Gegenstände in der Botanik, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, S. 203.

[4]) O. Linde, Zur Untersuchung des Kosoblütenpulvers, Apoth.-Ztg., 1911, XXVI, S. 136.

mäßig. Die Objektträger liefert Seibert-Wetzlar für 5 M. (Fig. 18). Sie verlangen ein recht vorsichtiges Arbeiten mit kleinen Tropfen, denn ein Austreten der Flüssigkeit über das Zählquadrat muß vermieden werden. Hartwich und Wichmann[1]) haben daher um die Einteilung einen Glasrahmen in Deckglashöhe (0,25 mm) aufkitten lassen. Auch bei diesen Zählkammern, die Seibert für 12 M. liefert, darf nur so viel Flüssigkeit genommen werden, daß die Kammer nicht ganz erfüllt ist. Die Kammer gestattet ein Arbeiten bis zur 290fachen Vergrößerung. Ähnliche Dienste, und auch bei stärkeren Vergrößerungen benutzbar, leistet das Okularnetzmikrometer (Zeiss, 5 M.), das auf einem Glasplättchen, welches auf die Blenden der Okulare zu liegen kommt, ein Quadrat von 5 mm, in kleine Felder (0,5 mm) geteilt, zeigt.

Messungen sind in der Mikrochemie häufig vorzunehmen. Nicht nur Membranen und Zellinhalte sowie nativ vorkommende Kristalle sind zu messen, auch die Größenverhältnisse der bei Fällungen erhaltenen Kristalle bieten immerhin einen, wenn auch recht geringen Anhaltspunkt, der aber bei Nachprüfungen angenehm ist. Von den verschiedenen Vorrichtungen zum Messen: Objekt-, Objektiv-, Okularmikrometer, hat sich das letztere, schon seines billigen Preises wegen (5 M.), am meisten eingebürgert. Es ist bekanntlich ein mit dem Maßstabe versehenes Glasplättchen, das auf die Blendung des Okulars zu liegen kommt. Der zu messende Gegenstand des Präparats wird unter den Maßstab gebracht. Die Teilstriche des letzteren müssen deutlich sichtbar sein, sie treten schärfer hervor, wenn man die obere Okularlinse etwas emporschraubt, also der Sehweite des Beobachters anpaßt. Bei genauer Messung muß das Objekt, wenn angängig, unter die Mitte des Maßstabes (nicht an den Endstrich) gebracht werden. Die abgelesenen Teilstriche, mit den dem Mikroskope beigegebenen, auf die Verzögerung sich beziehenden Werten multipliziert, geben die Maße in Mikromillimeter (ein Mikromillimeter $= 1\ \mu = 0{,}001$ mm) an. Um das Messen in stark gefärbten Präparaten zu erleichtern (vorzüglich für minder Geübte) hat Hartwich (Ztschr. f. wiss. Mikr. u. Apoth.-Ztg. 1901) Okularmikrometer konstruieren lassen (zu beziehen von Zulauf, Zürich), die mit 2 den Teilstrichen gleichlaufenden schwarzen Fäden versehen sind. Der erste Teilstrich ist durch einen feststehenden Faden gekennzeichnet, an diesen wird das Objekt angelegt, der andere schwarze Faden ist verschiebbar und wird an das Ende des Gegenstandes gebracht. Der Wert kann somit nach Entfernung des Präparates bequem abgelesen werden.

---

[1]) C. Hartwich u. A. Wichmann, Einige Beobachtungen an Stärkekörnern und über die Zählkammer, ein Hilfsmittel zur quantitativen Ermittelung von Verfälschungen vegetabilischer Pulver, Arch. d. Pharm., 1912, CCL, S. 452.

Aus den Maßen eines in der Zelle befindlichen Körpers läßt sich, falls die erforderlichen Werte des isolierten Körpers bekannt sind, das absolute Gewicht berechnen, wie es in einigen Fällen von Andrews und Richter bei Kristallen, von Mesnard bei Fetttropfen ausgeführt wurde.

Wägungen werden auf unserem Gebiete gegenwärtig noch nicht ausgeführt. Erst bei weiterem Ausbau der Mikrochemie wird die Mikrowage Eingang in die botanischen Institute finden. Die zweiarmige Hebelwage von Warburg und Ihmori, die Federwage von Salvioni, sowie die Wage von Steele und Grant, die noch 4 μg (ein Millionstel Gramm = 0,001 mg = 1 μg) angibt, sind im Handel nicht zu haben. Es käme im Bedarfsfalle nur die Nernst-Emichsche Wage in Betracht, die leicht zu handhaben ist, mit Fernrohrablesung für Wägungen bis zu 0,005 g bestimmt ist und dabei 1 μg anzeigt. Ohne Fernrohr kostet die Wage 100 M. (Spindler & Hoyer-Göttingen). Eine übersichtliche Abhandlung über die Mikrowagen brachte in neuerer Zeit W. Lenz[1]. Alle Bestimmungen, bei denen ein Niederschlag zur Wägung gelangt, können auf mikrochemischem Wege ebenso genau wie makrochemisch ausgeführt werden (Fehler im Mittel 0,3 %), erfordern aber bedeutend weniger Substanz (einige Milligramm genügen) und weit weniger Zeit[2]. — Über Bestimmungen des spezifischen Gewichtes findet sich eine kurze Darstellung bei Emich[3], über die Bestimmung des spez. Gewichtes der Stärke mit Hilfe des Regnaultschen Pyknometers eine ausführliche Schilderung bei Hartwich und Wichmann (Lit. s. S. 55).

Dauerpräparate und ihre Anfertigung.

In der Mikrochemie besitzen die Dauerpräparate nicht die gleiche Bedeutung wie in der Anatomie. Frisch hergestellte Präparate sind im allgemeinen vorzuziehen, besonders dann, wenn Fällungen und Niederschläge in den Zellen lokalisiert sind. Damit soll die Bedeutung der Dauerpräparate für mikrochemische Zwecke keineswegs in Abrede gestellt werden, in vielen Fällen werden sie von Wert sein. Die folgenden Zeilen sollen nur dem Anfänger einige Hinweise geben. Wir unterscheiden bei der Anfertigung der Dauerpräparate: die Vorbehandlung der Präparate, den Einschluß sowie den Verschluß (Zukitten) und Signierung. Anschaffung von Hilfsapparaten ist nicht erforderlich, die nötigen Lösungen kann man auch von Grübler-Leipzig beziehen.

Die **Vorbehandlung** hat den Zweck, die Präparate geeignet für das zu wählende Einschlußmedium zu machen. Zarte Präparate, die

---

[1] W. Lenz, Hilfsmittel zur Bestimmung kleinster Gewichtsmengen, Apoth.-Ztg., 1912, XXVII, S. 189.

[2] Die hierzu erforderliche Apparatur liefern die Ver. Fabr. für Laboratoriumsbedarf, Berlin N, Scharnhorststr. 22 für 125 M. (Filtriervorrichtung, Platin-, Quarz-, Glasutensilien, ohne Wage).

[3] F. Emich, Lehrb. d. Mikrochemie, 1911, S. 16.

in konzentriertes Glyzerin oder Glyzeringelatine eingeschlossen werden sollen, erleiden beim direkten Übertragen aus Wasser in diese Medien häufig Schrumpfungen. Daher saugt man zunächst das Wasser ab, fügt verdünntes Glyzerin zu und läßt die Objektträger (ohne Deckglas) an einem vor Staub geschützten Orte (unter einer Glasglocke) bis zur Vollsaugung mit Glyzerin liegen. Chloralpräparate müssen vor dem Einschließen in Glyzeringelatine mit Glyzerin behandelt werden. Über die Vorbereitung für Balsampräparate s. S. 36. Bei Trockenpräparaten ist eine Vorbereitung bei Sublimaten gewöhnlich nicht erforderlich, bei Fällungen müssen die Mutterlaugen möglichst entfernt werden. Zu diesem Zwecke wird mit einem fein zugespitzten Streifen Fließpapier die Mutterlauge sorgfältig abgesaugt, dann mit etwas Wasser oder verdünntem Alkohol ausgewaschen und die Waschflüssigkeit ebenfalls abgesaugt. Die Wahl der Waschflüssigkeit richtet sich naturgemäß nach der Natur der Kristalle. Die ausgewaschenen und abgesaugten Präparate werden unter der Glasglocke einige Zeit zum völligen Austrocknen liegen gelassen.

Der **Einschluß** erfolgt in Flüssigkeiten oder in Luft (Trockenpräparate). Die Wahl des Einschlußmediums ist von der Natur des Objektes abhängig (gefärbte oder ungefärbte Objekte, bei Kristallen die Löslichkeitsverhältnisse, die Brechungsexponenten von Objekt und Medium u. a.). Die besten Einschlußmedien sind entschieden Glyzeringelatine und von den Balsamen der Kanadabalsam.

Von dem früher vielfach üblichen und sonderbarerweise auch jetzt noch hier und da empfohlenen Einschließen in Glyzerin sieht man am besten ganz ab, denn Glyzerin weist gegenüber der Glyzeringelatine keine Vorteile, wohl aber mannigfache Nachteile auf. Glyzerin (konzentriert, mit gleichen Teilen Wasser verdünnt, oder mit Essigsäure schwach angesäuert) zieht die meisten Farbstoffe nach längerer Zeit aus, gewährt den Objekten im Präparate keinen festen Halt und gestaltet den Verschluß langwierig. Glyzerinpräparate dürfen nicht senkrecht aufbewahrt werden, da die Objekte sonst heruntersinken und dabei, falls sich mehrere in einem Präparate befinden, durcheinander geraten. Man begegnet zuweilen der Angabe, daß das Einschließen in Glyzerin das einfachste Verfahren wäre; es gestatte die Präparate ohne Übertragung, also unter dem gleichen Deckglase, unter dem man die Reaktion vorgenommen, einzuschließen, indem man Glyzerin durchsaugt, den Deckglasrand ordentlich trocknet und mit Asphaltlack verschließt (der gleiche Erfolg läßt sich jedoch bequemer mit Glyzeringelatine erreichen). Reinigung und Verschließung sind bei den lose liegenden Deckgläschen der Glyzerinpräparate recht schwierig. Von über 80 auf obige Weise 1898 hergestellten Präparaten haben sich nur einige wenige gut gehalten, bei der Mehrzahl ist der Lack mehr oder weniger tief unter das Deckglas eingedrungen. Ist man gezwungen, Glyzerin als Einschlußmittel anzuwenden, so muß zuerst auf dem Objektträger aus Xylol-Kanadabalsam (gleiche Teile käuflicher Balsam und

Xylol oder Chloroform) mit einem fein zugespitzten Holzstäbchen (Zahnstocher, Streichholz), oder einem dünnen Glasstäbchen ein Rahmen gezogen werden, der einen etwas größeren Umriß als das benutzte Deckglas besitzt und an einer Stelle nicht völlig schließt. Ist der Balsamrahmen etwas eingetrocknet, so wird er mit Glyzerin erfüllt und die Objekte werden eingelegt. Schließlich wird das Deckglas von einer Seite aus auf den Rahmen gelegt und etwas angedrückt, wobei das überschüssige Glyzerin durch die offene Stelle des Rahmens austritt und entfernt wird. Dann schließt man die offene Stelle des Rahmens mit Xylolbalsam und nun erst wird der Verschluß angebracht.

Am bequemsten ist das Einschließen in Glyzeringelatine[1]). Diese eignet sich für viele Kristallfällungen (Hesperidin, Scutellarin, Osazone) und manche Färbungen. Von der festen Gelatinemasse[2]) wird das erforderliche Quantum auf dem Objektträger durch gelindes Erwärmen verflüssigt und die Flüssigkeit in annähernder Deckglasgröße mit der Nadel flach gestrichen, wobei sich etwaige Luftbläschen leicht entfernen lassen. In die noch flüssige Gelatine werden die Präparate vom Rande her eingeschoben und nebeneinander möglichst in der Mitte des Tropfens angeordnet. Dann wird das einige Male durch die Flamme gezogene Deckglas von einer Seite aus aufgelegt und angedrückt. Das Andrücken geschieht hier und bei den Balsampräparaten durch einen Korkstopfen, der mit einem kleinen Gewichte beschwert wird. A. Meyer[3])

---

[1]) 7 g Gelatine (fein zerschnitten) werden mit 42 ccm Wasser über Nacht quellen gelassen, dann werden 50 ccm Glyzerin und 1 g Karbolsäure zugefügt; die Mischung wird unter Umrühren bis zum Verschwinden der Trübung erwärmt und noch warm durch ein feines zwischen den Fingern geriebenes Leinwandläppchen in eine passende Deckelkruke koliert. Bei Bedarf wird das nötige Quantum der erstarrten Masse entnommen. Man kann auch die kolierte Masse auf einen Teller in dünner Schicht ausgießen. Die erstarrte Schicht schneidet man „in kleine Würfelchen von ausprobierter, je einen flachen Tropfen bildender Größe“ (Ed. Strasburger, Praktikum, 2. Pensum, auch A. Zimmermann, Mikrotechnik, S. 40). Die Würfelchen werden zum Bedarf in einem verschlossenen Gefäße vorrätig gehalten. Mir scheint hiermit kein Vorteil gegeben zu sein, denn die Menge der Gelatine richtet sich nach der Beschaffenheit (Größe und Dicke) und der Anzahl der Präparate, wechselt somit von Fall zu Fall.

[2]) Andere bringen einen Tropfen der zuvor flüssig gemachten Gelatine auf den Objektträger. Dann wird entweder das Gefäß mit der Gelatine in warmes Wasser genügend lange eingestellt oder, wie es W. Behrens macht, der die Gelatine in Reagenzgläsern aufbewahrt, nur der obere Teil des Inhaltes über der Flamme geschmolzen. Durch den flüssig aufgetragenen Gelatinetropfen sollen Luftblasen vermieden werden (W. Behrens, Leitfaden der botan. Mikroskopie 1890, S. 174). Abgesehen davon, daß dieses Ziel nicht in erwünschtem Maße erreicht wird, verliert nach eigener Erfahrung die Masse durch das häufige Erwärmen ihr schnelles Erstarrungsvermögen und wird bräunlich.

[3]) A. Meyer, Mikroskopisches Praktikum, 1907, S. 76.

gebraucht ein mit etwas Schrot gefülltes Glasröhrchen. Andere „Objektpresser“, die mehrfach empfohlen wurden, sind entbehrlich, selbst bei Anfertigung von Serienpräparaten.

Überschüssige Gelatine tritt beim Andrücken des Deckglases aus und wird erst nach völligem Erstarren mit dem Messer abgeschnitten. Hat man zu wenig Gelatine genommen, dann füge man nicht gleich neue hinzu, sondern erwärme zunächst das Präparat nochmals und halte es kurze Zeit etwas schräg, damit die Masse sich nach der leeren Stelle hinziehen kann. Neue Masse setze man erst hinzu, wenn es sich nach dem Anpressen des Deckglases als unbedingt nötig erweist. Man bringt dann mit der Nadel etwas feste Gelatine an den Deckglasrand und erwärmt das Präparat gelinde. Dadurch tritt die zugesetzte Masse unter das Deckglas ein, ohne daß man dieses abzuheben braucht. — Gilt es sehr zarte Objekte einzuschließen, die ein Abheben des Deckglases oder gar ein Übertragen nicht zulassen, so bringt man nach vorsichtigem Durchsaugen von verdünntem Glyzerin an den Deckglasrand etwas Glyzeringelatine, die man unter Anwendung von gelinder Wärme unter das Deckglas einsaugt. Sind störende Luftblasen entstanden, so entfernt man diese, indem man das Präparat nochmals erwärmt oder es längere Zeit auf einer warmen Platte (Ofen) liegen läßt. Oft gelingt es, die Schnitte aus Luftblasen an den wieder flüssig gemachten Präparaten durch ein unter das Deckglas geschobenes Roßhaar oder Schnurrbarthaar herauszubringen oder die Blasen an den Rand zu schieben. Derart lassen die Schnitte sich auch zurechtrücken, falls sie beim Auflegen des Deckglases übereinander oder zu nahe dem Deckglasrande gekommen sind. — Kleine Objekte (Pollenkörner, Stärke, Trichome) dringen beim Auflegen des Deckglases meist bis an den Deckglasrand vor, wenn man sie in die flüssig gemachte Gelatine eingetragen hat. Um dieses zu vermeiden, breitet man den flüssigen Gelatinetropfen in Deckglasgröße auf dem Objektträger aus, läßt ihn erstarren, bringt auf die Mitte desselben die Objekte, legt das Deckglas auf und verflüssigt jetzt vorsichtig die Gelatine. Auf diese Weise bleiben selbst sehr kleine Objekte im Gesichtsfelde. — Der Verschluß wird erst nach einem Jahre angebracht. Präparate von Drogen, 1892 mit Glyzeringelatine bereitet, sind jetzt noch von tadelloser Beschaffenheit.

Ein Einschlußmittel, dessen Lichtbrechung der des konz. Glyzerins und der Glyzeringelatine gleichkommt, hat Bálint[1]) angegeben. Die

[1]) S. Bálint, Botanisch-mikrotechnische Notizen, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1910, XXVII, S. 243.

Objekte schrumpfen in dem Gummi-Zucker-Gemisch[1]) nicht: auch soll eine Lackumrandung nicht erforderlich sein. Die Schnitte müssen vor dem Einbetten Glyzerin passiert haben. — In gleicher Weise wird das Apáthysche Gemisch benutzt (Ztschr. f. wiss. Mikr., 1892, IX, S. 37; gleiche Teile Gummiarabikum, Rohrzucker und Wasser mit 0,01 % Thymolzusatz). Bei zarten Objekten wird die Mischung mit Wasser verdünnt benutzt; nach dem Einlegen der Objekte läßt man die Präparate an der Luft eindicken.

Kanadabalsam[2]) ist ein vorzügliches Einschlußmittel; es wird überwiegend für farbige Kristalle und ganz allgemein bei Mikrotomschnitten gebraucht, die infolge ihrer Vorbehandlung besonders hierzu geeignet sind. Die Präparate erhärten allerdings selbst bei mäßiger Wärme erst nach mehreren Tagen (bei Zimmertemperatur erst nach Wochen), zeichnen sich aber durch große Haltbarkeit aus. Vor allem achte man darauf, nicht zuviel Balsam zu nehmen. Im übrigen ist die Ausführung ebenso wie bei der Gelatine. Kanadabalsam ruft oft gute Differenzierungen der Färbungen hervor und hellt die Präparate stark auf. Aber gerade das starke Aufhellungsvermögen ($n = 1{,}54$) macht den Balsam für zarte und ungefärbte Objekte, wie Stärke, verschiedene Zellmembranen, Diatomeen u. a. weniger geeignet. In solchen Fällen greift man zu anderen Balsamen, so zum venetianischen Terpentin[3]) (auch anwendbar bei Safranin-, Carmin-, Hämatoxylinfärbungen), zum

[1]) Gummi arabicum 40, Hutzucker 60, Wasser zur Lösung, Kaliumazetat 10 g und je 10 ccm Eisessig, Glyzerin und Laktophenol. Die filtrierte Gummilösung wird mit der Zuckerlösung und dem Kaliumazetat gemischt und die Mischung auf dem Wasserbade eingedickt (bis zur Hautbildung), dann mit den anderen Bestandteilen versetzt und in weithalsige Gläser gefüllt. Der entstandene Schaum wird durch Einstellen des Gefäßes in warmes Wasser entfernt.

[2]) Es ist ratsam, eine Xylollösung von festem Kanadabalsam zu benutzen, der frei von bleichendem Terpentinöl ist und besser erhärtet. Fester Balsam wird gepulvert in viel Xylol gelöst, die Lösung wird filtriert, das Filtrat durch freiwilliges Eindunsten zur Sirupkonsistenz gebracht und diese Masse, „Xylol-Balsam", in Tuben gefüllt. Vorteilhaft bezieht man die Balsamlösungen von Grübler-Leipzig, die saure Balsamlösung ist für Färbungen mit Hämatoxylin und sauren Farbstoffen, die neutrale, die vor Licht und Luft geschützt werden muß, ist für Präparate, die mit basischen oder neutralen Farbstoffen gefärbt sind (nach O. Linde, Die Darstellung pharmakognostischer Dauerpräparate, Apoth.-Ztg., 1910, XXV, S. 837). — Kanadabalsam wurde zuerst 1883 von Hillhouse empfohlen.

[3]) 100 g venetianischer Terpentin wird mit 100 ccm Alkohol in lose bedeckter Flasche 3 Wochen lang unter Umschütteln mazeriert, bis eine hellgelbe Lösung resultiert. Die Lösung wird nur sehr langsam fest (Vosseler, Venetianisches Terpentin als Einschlußmittel für Dauerpräparate, Ztschr. f. wiss. Mikrosk., 1889, VI, S. 292).

Dammarharz[1] (n = 1,50, Teerfarben, farblose Kristalle), Styrax[2] (n = 1,58, Diatomeen), Metastyrol[3] (n = 1,58, Kristalle), Tolubalsam[4] (n = 1,64), α-Monobromnaphthalin (n = 1,66, Diatomeen) u. a.

Zu außergewöhnlich großen und dickeren Schnitten eignet sich Gelatine nicht so gut wie Balsam. Die Schnitte werden mit Glyzerin völlig durchtränkt, oberflächlich zwischen Fließpapier abgetrocknet, dann auf dem Objektträger in einen hinreichend großen Tropfen von dünnflüssigem Xylol-Kanadabalsam gebracht, die Luftblasen durch vorsichtiges Erwärmen entfernt und schließlich in Balsam eingeschlossen. Dünne Objektträger dienen als Deckgläser[5].

Trockenpräparate sind bisher in der Pflanzenmikrochemie wenig beachtet und nur zur Aufbewahrung von Aschenskeletten empfohlen worden. Mit der Einbürgerung der Mikrosublimate kommt den Trockenpräparaten eine größere Bedeutung zu. Die Einbettung ist sehr einfach. Die lufttrockenen Sublimate oder Niederschläge (S. 57) werden mit dem Deckglase bedeckt und dieses mit Wachs oder Paraffin umrandet. Beide Wachse lassen sich in geschmolzenem Zustande mit einem zugespitzten Hölzchen oder einem feinen Pinsel auftragen. Man kann auch von beiden Körpern größere feste Stücke vorrätig halten; bei Bedarf nimmt man eine auf einen Flaschenkork (als Handgriff) gesteckte Haarnadel, die man am Knie erhitzt und heiß in die Stücke einsticht. Das an der Nadel haftende flüssige Wachs wird dann aufgetragen. Liegen zarte Objekte vor, die durch das Deckglas zerdrückt werden können, so zieht man zunächst auf dem Objektträger einen Stützrahmen aus Wachs, auf den das Deckglas zu liegen kommt, welches nochmals umzogen wird. An Stelle des Wachsrahmens lassen sich Rahmen von Schreibpapier verwenden (in Form der Pappdeckel zur feuchten Kammer, doch nur von Deckglasgröße). Der Rahmen wird in Wasser etwas eingeweicht, zwischen Fließpapier abgepreßt, mit flüssigem Leim[6]) getränkt und der Überfluß des Kleb-

---

[1]) Mehrtägige Mazeration von gleichen Teilen Damar, Terpentinöl und Benzol; die Lösung wird abgegossen, filtriert und das Filtrat bis zur Sirupkonsistenz der Verdunstung überlassen. Bei Xylol-Damar muß Xylol in mehrfacher Menge zur Lösung genommen werden (Behrens-Küster, Tabellen 1908, H. Behrens, Mikrochemische Technik, 1900).

[2]) 100 g Styrax in 100 g Chloroform gelöst, die filtrierte Lösung, mit 1000 ccm Benzin versetzt, bis zur Sirupkonsistenz eindunsten lassen.

[3]) Metastyrol ist eine farblose Flüssigkeit.

[4]) Eine eingedickte Lösung von 100 g Tolubalsam in 300 g Chloroform.

[5]) H. Schenck, Über Einschließen von größeren Schnitten zur Herstellung von Demonstrationspräparaten, Bot. Centralbl., 1893, LIV, S. 1.

[6]) Als Leim empfiehlt F. Emich (Mikrochemie 1911, S. 203 u. 158) „Wisein“ von Th. Schroeter, Leipzig-Connewitz.

stoffes durch Pressen zwischen zwei Objektträger entfernt. Nun wird der Rahmen, dann das Deckglas aufgelegt und letzteres durch Kork und ein größeres Gewicht (200 g) angepreßt.

Einen **Verschluß** pflegt man bei allen Präparaten anzubringen. Präparate, die in einem flüssig bleibenden Medium eingebettet sind, müssen sofort luftdicht verkittet werden, damit die Flüssigkeit nicht verdunsten kann. Wie bei Glyzerinpräparaten benutzt man bei Metastyrol u. a. hierzu Kanadabalsam. Zunächst bringt man einen schmalen Verschlußstreifen an, und nachdem dieser eingetrocknet ist, umzieht man nochmals. Ein guter Verschluß muß auf allen Seiten gleich stark sein und gleich weit auf Deckglas und Objektträger übergreifen. Balsampräparate erhalten nach völligem Eintrocknen des Balsams, Gelatinepräparate erst nach 6—9 Monaten einen Lackverschluß[1]). Verschlußlacke sind in großer Zahl empfohlen worden. Wenn auch die Herstellung der meisten nicht mühevoll ist, so ist es vorteilhafter, sie gebrauchsfertig zu beziehen. Am meisten gebraucht wird Asphaltlack (115 g Asphalt, 120 g Leinöl, 260 g Terpentinöl) und Maskenlack.

Signierung: Schließlich werden die Präparate signiert. Zu diesem Zwecke werden den Objektträgern beiderseits vom Präparate zwei Quadrate aus starkem Papier aufgeklebt, welche die nötigen Bezeichnungen aufnehmen. Zum Ankleben benutzt man Wisein oder flüssigen Leim von Le Page der Russia Cement Co.; beide sind in Tuben und kleben sehr schnell und fest (die früher benutzten Klebmittel: Baumwachs, Gelatine in Eisessig, Gummiarabikum-Kalziumkarbonat u. a. sind nicht so gut). Die Rückseite des Papiers wird mit dem Leim bestrichen, den man erst einige Augenblicke einziehen läßt. Dann trägt man die Etiketten auf, beschwert sie aber nicht direkt, sondern legt die Objektträger um; durch das Gewicht der Objektträger wird eine ausreichende Pressung erzielt.

Wer über Präparatenkästen[2]) verfügt, kann die Signierung auch direkt auf dem Objektträger vornehmen. Dies wurde besonders früher empfohlen, als gute Klebstoffe nicht zur Verfügung standen und die Etiketten öfters abfielen. Schoebel[3]) empfahl für schwarze Schrift eine Mischung von 1—2 Teilen Wasserglas und 1 Teil flüssiger chine-

[1]) Diese Präparate erhalten eine vorläufige Bezeichnung, d. h. die nötigen Daten werden mit schwarzer Tusche von Günther Wagner-Hannover-Wien direkt auf den Objektträger geschrieben. Die Tusche trocknet sehr schnell, haftet fest am Glase und verträgt trockenes Abwischen.

[2]) Bezugsquelle: Th. Schroeter, Leipzig-C.

[3]) E. Schoebel, Vorschläge zu einer rationellen Signierung von Präparaten und Reagentien, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1894, XI, S. 331.

sischer Tusche (Bezugsquelle: E. Wolff & Son, London), für weiße Schrift 3—4 Teile Wasserglas und 1 Teil chinesisches Permanentweiß (Winsor & Newton, London). Beide Tuschen trocknen jedoch recht langsam, und am einfachsten und besten ist es jedenfalls, mit schwarzer Tusche von Günther Wagner-Hannover-Wien zu signieren. Schiefferdecker[1]) empfiehlt ferner die flüssige chinesische Tusche „Atral" von A. Leonhardi-Dresden und Unna[2]) die Glastinte aus Gelanth (7,5 g Gelanth, 7,5 g Zinkoxyd. 15 g Wasser, Schwanenapotheke, Hamburg).

Die Präparate können aber auch tadellos in einfachster Weise in die leeren Objektträgerkartons übereinander eingestellt werden, wenn man zu den Etiketten einen Pappkarton von der Stärke der Objektträger (1—1,5 mm) wählt[3]). Die Etiketten müssen so stark sein, daß bei übereinander geschichteten Objektträgern Deckglas und Lackring des einen Präparates nicht den nächsten Objektträger berühren. Ein auf dem Deckel der Schachtel angebrachtes Verzeichnis erleichtert das Herausfinden der Präparate. Gelatinepräparate, 1901 auf diese Weise eingelegt, sind noch jetzt in gutem Zustande, trotzdem sie mehrere Male mit der Post versandt wurden.

Früher wurde öfters über ein Beschlagen der Deckgläser oder Objektträger bei alten Dauerpräparaten geklagt. Nach Weber[4]) sollte ein zu hoher Prozentgehalt der Gläser an Kalk das Beschlagen bewirken, bei schlechtem Glase verhält sich Kalk zu Alkali wie 1 : 1,74, bei guten Gläsern beträgt das Verhältnis 1 : 0,8.

Zur schnellen Herstellung von Halbdauerpräparaten hat sich wiederholt (Aleuron, Agar-Agar-Diatomeen) eine konzentrierte Rohrzuckerlösung (event. mit Thymol versetzt) als brauchbar erwiesen (Tunmann), für Diatomeen ist Chinolin, das sich nur sehr langsam verflüchtigt, geeignet (Amann).

---

[1]) P. Schiefferdecker, Das Signieren von Präparaten, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1896, XIII, S. 299.

[2]) P. G. Unna, Monatshefte f. prakt. Dermatologie, 1901, XXXII, S. 343.

[3]) O. Tunmann, Über die Anfertigung einer mikroskopischen Präparatensammlung, Pharm. Ztg., 1906, LI, S. 1079.

[4]) R. Weber, Über den Einfluß des Glases der Objektträger und Deckgläser auf die Haltbarkeit mikroskopischer Präparate, Fortschr. d. Med., 1893, XI, S. 49; Ref. in Ztschr. f. wiss. Mikr.

B. Spezielle Mikrochemie.

I. Anorganischer Teil.

Sauerstoff.

Priestley wies schon die Abgabe von Sauerstoff durch assimilierende Pflanzen im Sonnenlichte nach. In der Physiologie benutzt man zu derartigen Experimenten vorzugsweise Wasserpflanzen, bei denen der Sauerstoff durch die gesamte Blattfläche ausgeschieden wird, während er bei Landpflanzen durch die Spaltöffnungen nach außen gelangt. Quantitativ ermittelt man den ausgeschiedenen Sauerstoff, indem man die Pflanzen oder Pflanzenteile in einen Rezipienten einschließt, in diesen einen Strom kohlensäurehaltiger Luft mit bestimmtem Sauerstoffgehalt einleitet und sodann in der abgesaugten Luft die Zunahme an Sauerstoff bestimmt. Pfeffer[1]) hat für abgeschnittene Blätter einen eigenen Apparat konstruiert. Hoppe-Seyler[2]) läßt den abgegebenen Sauerstoff auf Bluthämoglobin wirken und prüft letzteres spektralanalytisch. Helodeasprosse werden mit Wasser und etwas faulendem Blute in ein Glasrohr eingeschmolzen. Der im Glasrohr befindliche Sauerstoff wird nach einiger Zeit vollständig absorbiert, spektralanalytisch läßt sich in der Flüssigkeit kein Oxyhämoglobinstreifen mehr nachweisen. Bringt man nun das Glasrohr ins Sonnenlicht, dann assimiliert der Sproß, gibt von neuem Sauerstoff ab, die Flüssigkeit zeigt wiederum bei der spektroskopischen Prüfung den Oxyhämoglobinstreifen. Derart lassen sich noch 0,002 ccm Sauerstoff nachweisen, doch eignen sich nicht alle Wasserpflanzen zu diesem Versuch.

Zum mikroskopischen Nachweis bedient man sich der Bakterienmethode von Engelmann[3]). Die erforderlichen Bakterien sind leicht zu beschaffen. Man erhält sie, wenn man Erbsen oder andere Hülsenfrüchte einige Tage in Wasser faulen läßt. Von diesem faulenden Wasser überträgt man einen Tropfen in Cohnsche Normallösung (1 g

---

[1]) W. Pfeffer, Pflanzenphysiologie, II. Aufl., 1897, I, S. 292.

[2]) F. Hoppe-Seyler, Ztschr. f. phys. Chem., 1877, I, S. 121.

[3]) Th. W. Engelmann, Neue Methode zur Untersuchung der Sauerstoffausscheidung pflanzlicher und tierischer Organismen, Botan. Ztg., 1881, XXXIX, S. 441.

saures phosphorsaures Kali, 1 g schwefelsaure Magnesia, 2 g neutrales weinsaures Ammoniak, 0,1 Chlorkalzium, 200 g destilliertes Wasser). Nach wenigen Tagen erhält die milchig trübe gewordene Nährlösung eine grünliche Kahmhaut, die im Zoogloea-Stadium unbewegliche Bakterien enthält, während in der Nährlösung sich zahlreiche 1,5 μ lange stäbchenförmige Bakterien finden, die in ruckweiser Bewegung begriffen sind. Diese Bakterien stellen ihre Bewegungen bei Sauerstoffmangel ein, um sie bei Zutritt von Sauerstoff sofort wieder aufzunehmen, und zwar in der Richtung der Sauerstoffquelle hin. Bringt man einen Tropfen der die Bakterien enthaltenden Nährlösung unter Deckglas, so erhalten die Bakterien ihre Bewegungen am längsten am Deckglasrande, wo die letzten Sauerstoffmengen noch vorhanden sind, und sammeln sich dort auch an. Man bringt das zu prüfende möglichst zarte Präparat (zur Demonstration verwendet man Algenfäden, Spirogyra) in einen Tropfen Wasser, fügt eine größere Anzahl der gezüchteten Bakterien (B. Termo) zu und verkittet den Deckglasrand mit Wachs, Paraffin, Vaselin oder Kakaobutter, um sowohl Strömungen im Untersuchungstropfen zu verhindern, als auch die Flüssigkeit vor dem Verdunsten zu schützen und auch den Zutritt neuen Sauerstoffes zu verhindern. Die Bakterien sammeln sich an der Sauerstoffquelle, bei Spirogyra beispielsweise an jenen Stellen, an denen das Chlorophyllband der Membran anliegt. Bei Verdunklung des Präparates, bei Einstellung der Assimilation, hört die Bakterienbewegung auf, um bei erneuerter Belichtung momentan wieder einzutreten.

Mittels eines Mikrospektralobjektivs läßt sich auch die Stärke der Kohlensäureassimilation in allen Teilen des Spektrums messen. Näheres hierüber bei Engelmann, Bot. Ztg., 1882, XL, S. 419.

In neuerer Zeit wird die Photo-Methode von Beijerinck[1]) angewandt. Sie gelingt nicht nur mit Pflanzenteilen (Fucus, Helodea), sondern auch wenn man lebende Blätter vom Klee mit destilliertem Wasser zerreibt und das Filtrat, welches zahlreiche Chlorophyllkörner enthält, mit Leuchtbakterien in einer Flasche mischt. Nach kurzer Zeit (etwa $^1/_2$ Stunde) wird die Mischung dunkel. Von neuem dem Licht ausgesetzt, wird die Flüssigkeit wieder leuchtend, d. h. die Bakterien leuchten wieder, infolge des im Lichte entbundenen Sauerstoffes. Molisch[2]) verwendet als Leuchtbakterie Micrococcus phosphoreus Cohn,

---

[1]) M. W. Beijerinck, Kulturvers. m. Zoochlorellen, Bot. Ztg. 1890, S. 744. Photobacter. as a React. in the Investig. of the Chlorophyllfunction, K. A. Amsterdam 1901, S. 45, Zentralbl. f. Bakt., 1902, IX, S. 685.

[2]) H. Molisch, Über Kohlensäureassimilationsversuche mittels der Leuchtbakterienmethode, Botan. Ztg., 1904, LXII, S. 1.

der von Rindfleisch leicht zu erhalten ist, und benutzt zur Kultur eine schwach alkalische Fleischbouillon von folgender Zusammensetzung: 1 Liter verdünnter Rindfleischsaft (von $^1/_8$ kg Rindfleisch), 10 g Pepton, 10 g Glyzerin und 30 g Kochsalz. Präparatengläser (etwa von 9 cm Höhe und von 2 cm lichter Weite mit Glasstöpseln) werden zu $^1/_3$ mit dem Filtrat des Pflanzenbreies beschickt, dann mit leuchtender Bouillon völlig angefüllt und der Stöpsel unter Vermeidung von Luftblasen aufgesetzt. Am besten gelingen die Versuche bei 5—20° C, da bei dieser Temperatur Micrococcus phosphoreus seine größte Leuchtkraft besitzt. Versuchsobjekte sind Blätter von Trifolium pratense, Lamium album, Sambucus nigra, Calendula officinalis, welche auch grüne Preßauszüge geben. Bräunlich gefärbte Filtrate (von Robinia pseudacacia, Rheum, Abies excelsa) bringen die Photobakterien nicht zum Aufleuchten. Selbst der Preßsaft von toten Blättern von Lamium album entbindet Sauerstoff und bewirkt ein Aufleuchten. Doch dürfen die Blätter nur an der Luft und im Exsikkator getrocknet sein und nicht bei 100° C. Hingegen vertragen sie ein Trocknen bei 50—70°, wie V. Baldasseroni[1]) fand (bei Spinacia oleracea, Senecio vulgaris, Veronica u. a.), der als Leuchtbakterie Micrococcus phosphoreus und Photobacterium italicum benutzte.

Der Nachweis mit Leuchtbakterien und Preßsäften hat ein größeres Interesse, da man eine Zeitlang der Ansicht zuneigte, daß die Photosynthese ausschließlich auf enzymatische Vorgänge zurückzuführen wäre. Auch Usher und Pristley[2]) sagen, daß zur Photosynthese aus Kohlensäure und Wasser nötig sind: lebendes Protoplasma, Gegenwart eines katalytischen Enzyms und die Anwesenheit von Chlorophyll. Die Versuche zeigen jedoch nur, daß die Sauerstoffentwicklung auf die Tätigkeit der Chlorophyllkörner zurückzuführen ist, die in den Auszügen zugegen sind und auch nach dem Trocknen der Blätter eine Zeitlang ihre assimilatorische Fähigkeit beibehalten, falls sie nicht zu sehr geschädigt sind.

Wasserstoffsuperoxyd.

Wasserstoffsuperoxyd hemmt das Wachstum und ist für Pflanzen stark giftig, eine Ansicht, die allerdings von Bach und Chodat[3]) verneint wurde. Nach Pfeffer (Physiologie) schadet „eine vorübergehende Einwirkung einer konz. Lösung weniger als eine andauernde Einwirkung einer verdünnten Lösung". Einer der ersten, der sich mit dem Nachweis von Wasserstoffsuperoxyd in den lebenden

[1]) V. Baldasseroni, Ricerche sull'assimilazione del carbonio fuori dell' organismo virente, Annali di Bot., 1906, IV, S. 287.

[2]) F. L. Usher u. J. H. Pristley, A study of the mechanism of carbon assimilation in green plants, Proc. roy. Soc., 1906, LXXVII, S. 369.

[3]) R. Chodat und Bach, Ber. chem. Ges., 1902, XXXV, S. 2487.

Geweben beschäftigte, war Clermont[1]). Seine positiv ausgefallenen Versuche wurden jedoch von Bellucci[2]) nicht bestätigt und auch die in den folgenden Jahren von Loew[3]), Bokorny und Pfeffer angestellten Untersuchungen konnten den Beweis für die Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd in den lebenden Zellen nicht erbringen.

Bokorny[4]) benutzte zum Nachweis lebende Spirogyren. Stärkehaltige Spirogyren wurden in eine sehr verdünnte Lösung von Eisenvitriol und Jodkalium gebracht. Bei Anwesenheit von Wasserstoffsuperoxyd hätten die Zellen Blaufärbung zeigen müssen, da Wasserstoffsuperoxyd bei Gegenwart von Eisenchlorid aus Jodkalium Jod frei macht und letzteres die Stärke bläut. Zellfäden, die mit Wasserstoffsuperoxyd getränkt waren, zeigten die Färbung, die lebenden Spirogyren aber nicht. Ein negatives Resultat lieferte auch ein Verfahren, welches den eisenbläuenden Gerbstoff der Spirogyren zur Reaktion heranzog, der bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd durch Eisenvitriol sofort blau gefärbt wird. Wasserstoffsuperoxyd fehlte, die Blaufärbung trat erst ganz allmählich ein und war eine Folge der langsamen Oxydation des Eisenvitriols durch die Luft. — Bokorny lieferte auch experimentell den Nachweis, daß die benutzten, stark verdünnten Reagentien von den lebenden Zellen aufgenommen werden. Pfeffer[5]), der anfangs gegen vorstehende Befunde Einwände erhob, kam bei erneuerten Versuchen zu gleichen Resultaten und konnte insbesondere bestätigen, daß lebende Zellen sehr gut ohne Störung stark verdünnte Reagenzlösungen (Eisenvitriol, Cyanin) aufzunehmen vermögen. Er zeigte, daß künstlich in den Zellsaft eingeführte Wasserstoffsuperoxydlösungen (0,01—0,1 %; die in der käuflichen Lösung enthaltenen Spuren freier Salzsäure werden zuvor mit Natriumbikarbonat neutralisiert) abnorme Oxydationsprozesse hervorrufen. Beispielsweise wird der farblose Zellsaft in den Epidermiszellen der Keimpflanzen von Vicia faba (Stengel, Wurzel) oder der in den Wurzelhaaren von Trianea bogotensis braungefärbt, nach längerer Einwirkung erfolgt Ausscheidung braunschwarzer, körniger Massen.

Außerdem zeigte sich, daß blauer Zellsaft durch Wasserstoffsuper-

---

[1]) Clermont, Compt. rend., 1875, LXXX, S. 1591.

[2]) Bellucci, Ber. chem. Ges., 1876, IX, S. 83.

[3]) O. Loew, Ber. chem. Ges., 1889, XXII, S. 146.

[4]) Th. Bokorny, Das Wasserstoffsuperoxyd und die Silberabscheidung durch aktives Albumin, Jahrb. f. wiss. Bot., 1886, XVII, S. 347. Über d. Nachweis von Wasserstoffsuperoxyd in lebenden Pflanzenzellen, Ber. d. botan. Ges., 1889, VIII, S. 275.

[5]) W. Pfeffer, Beiträge zur Kenntnis der Oxydationsvorgänge in lebenden Zellen, Abh. Sächs. Ges. d. Wissensch., math. natur. Kl. 1889, XV, S. 375.

oxyd entfernt wird oder gelbe bis braune Farbe annimmt. Hierauf fußend, wurde nun eine durch Erwärmen bereitete wässerige Cyaninlösung in Wurzelhaare (Trianea bogotensis) eingeführt, die Zellen nehmen lebend den Farbstoff auf. Nachfolgender Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd bewirkte wiederum innerhalb einer Minute Entfärbung des künstlich gefärbten Zellinhalts.

Auch naphthansaures Kobalt wäre zu probieren. Charitschkoff[1]) benutzt makrochemisch ein mit naphthansaurem Kobalt getränktes Papier, das Wasserstoffsuperoxyd noch in einer Verdünnung von 1 : 1000000 durch Farbenumschlag von rosa nach olivgrün anzeigen soll. Sehr empfindlich ist ferner die Reaktion mit essigsaurem Benzidin. Wenn man 5 ccm einer Wasserstoffperoxydlösung, die 0,0001 g Wasserstoffperoxyd im Liter enthält, mit 1/2 ccm einer 5%igen Lösung von Gummi arabicum mischt und einige Tropfen Benzidinazetat zufügt, dann tritt deutliche Blaufärbung auf[2]).

Schwefel.

Schwefel findet sich in den Pflanzen vorzugsweise in organischer und anorganischer Bildung, tritt aber auch in elementarer Form auf.

In **elementarer Form** kommt Schwefel mit Sicherheit nur in niederen Pflanzen vor. Studienobjekte sind Schwefelbakterien und -algen. Cramer[3]) hatte Schwefelkörnchen in Beggiatoaarten entdeckt, später berichtete Cohn[4]) über schwefelhaltige Organismen. Unser heutiges Wissen verdanken wir im wesentlichen Winogradsky[5]). Eine umfassende Darstellung gab in neuerer Zeit Omelianski[6]). In Oscillarien fand Hinze[7]) schwefelhaltige Gasvakuolen und Lauterborn[8]) im Bodensee mit Gallertscheiden versehene Bakterien mit Schwefelkörnchen erfüllt, die er Thioploca nennt. Jönsson[9]) gibt für das Mycel von Penicillium, das auf verdünnter Schwefelsäure gezogen war, Schwefelkörper an, die denen der Beggiatoa nahestehen und aus Schwefel und einer ölartigen Substanz bestehen sollen. Schwefelbakterien sind stets in schwefelhaltigen Gewässern anzutreffen, oxydieren Schwefelwasserstoff zu Schwefel, verbrennen letzteren interzellulär weiter zu

---

[1]) K. W. Charitschkoff, Chem. Ztg., 1910, XXXIV, Rep. S. 529.

[2]) Journ. de Pharm. d'Anvers, 1907, S. 377.

[3]) C. Cramer, Chem. phys. Beschr. d. Thermen von Baden in d. Schweiz, 1870.

[4]) Ferd. Cohn, Beitr. z. Biologie d. Pfl., 1875, I, S. 141.

[5]) S. Winogradsky, Beitr. z. Morph. u. Physiologie d. Bakterien, 1888, Heft 1, Schwefelbakterien.

[6]) Omelianski, Der Kreislauf d. Schwefels in Lafars Handbuch d. techn. Mykologie, 1904, III.

[7]) G. Hinze, Schwefeltropfen in Oscillarien u. Gallen von Beggiatoa m., Ber. d. bot. Ges., 1900, XVIII, S. 394 u. 1901, XIX, S. 369.

[8]) Lauterborn, Ber. d. bot. Ges., 1907, XXV, S. 238.

[9]) Jönsson, Entstehung schwefelhaltiger Ölkörper in den Mycelfäden von Penicillium glaucum, Bot. Centralbl., 1889, XXXVII, S. 201.

Schwefelsäure und erreichen dadurch den gleichen Nutzeffekt, den andere Organismen mit der Atmung erzielen. Miyoshi[1]) berichtet über die Schwefelbakterien japanischer Thermen. Zu den farblosen Bakterien zählen dort: Thiotrix und Beggiatoa, von roten Schwefelbakterien kamen Chromatium-Arten und Thioderma roseum vor. Bütschli[2]) fixierte Schwefelbakterien mit Jodalkohol und färbte mit Delafields Hämatoxylin. Aspergillus niger bildet bei Kultur auf Lösungen von thioschwefelsaurem Natrium Schwefeltröpfchen in den Hyphen, in abgestorbenen Zellen kristallisiert der Schwefel in Form von Doppelpyramiden aus[3]).

Die wasserbewohnenden Schwefelbakterien sind leicht zu züchten. Man zerschneidet ein frisch aus dem Sumpfe ausgehobenes Rhizom einer Butomusart sofort, ohne es abzuwaschen, und übergießt es in einem geeigneten Gefäße mit 3—5 Liter Wasser, dem einige Gramm Gips zugesetzt sind. Nach einigen Tagen tritt Schwefelwasserstoffgeruch auf, der Bodensatz färbt sich schwarz, die Flüssigkeit wird opaleszent und in einigen Wochen sind Schwefelbakterien aufindbar, vorzugsweise farblose, bewegliche, relativ starke (bis 35 μ) Beggiatoafäden, dann farblose festsitzende Thiotrixfäden: daneben treten auch rote Formen auf. Das Gefäß muß im Dunkeln gehalten werden, im Lichte entwickeln sich grüne Oscillarien und grüne Zooglöen, der Schwefelwassergeruch hört allmählich auf. Man kann ferner Schwefelbakterien durch Mazeration von Heu in gipshaltigem Wasser gewinnen. Zerkleinertes Heu wird 10 Tage in Wasser mazeriert und dann wiederholt in reinem Wasser gekocht. Eine Handvoll von diesem Heu wird in ein tiefes Gefäß mit gipshaltigem Wasser gebracht und eine Messerspitze Sumpfschlamm zugesetzt. Bereits nach wenigen Tagen beginnt die Entwicklung von Schwefelwasserstoffgeruch. Die Beggiatoafäden, die zunächst ungegliedert erscheinen, sind mehr oder weniger angefüllt mit verschieden großen, stark lichtbrechenden, zähflüssigen oder ölartigen Schwefelkugeln. Die Querwände der einzelnen Zellen treten erst nach längerem Verweilen der Fäden in Brunnenwasser deutlich hervor, wobei allerdings die Schwefelkugeln rasch abnehmen (die Querwände sind übrigens an entschwefelten Fäden gut zu sehen, besonders nach Zusatz von Jodreagentien).

Die Schwefelkugeln lösen sich unter Deckglas nicht in Wasser und Salzsäure, hingegen ziemlich schnell in heißer Kalilauge, in Sal-

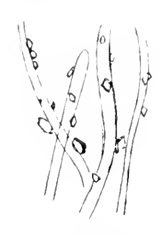
[1]) M. Miyoshi, Studien über die Schwefelrasenbildung und die Schwefelbakterien der Thermen von Yumoto bei Nikko, Journ. of the Coll. of Sc. Univ. Tokyo 1897, X.

[2]) O. Bütschli, Bemerkungen über Cyanophyceen und Bacteriaceen, Arch. f. Protistenk., 1902, I, S. 41, Ref. Ztschr. f. wiss. Mikr., 1902, XIX. S. 119.

[3]) M. Raciborski, Einige Chemomorphosen des Aspergillus glaucus. Bull. de l'Ac. de Cracovie, 1906, S. 764.

petersäure + chlorsaurem Kali, in einer wässerigen Lösung von schwefligsaurem Natron und beim Durchsaugen von absolutem Alkohol. In Schwefelkohlenstoff sind sie ebenfalls bis auf Spuren löslich, doch durchdringt derselbe die lebende Zellmembran schlecht. Man tötet die Fäden, indem man sie auf dem Objektträger eintrocknen läßt und fügt dann erst Schwefelkohlenstoff zu. Bütschli[1]) fand ferner die Kugeln in 10% wässeriger Sodalösung und innerhalb eines Tages in künstlichem Magensaft löslich.

Da der Schwefel in den lebenden Zellen in seiner amorphen oder plastischen Modifikation auftritt, so benutzt man seine Überführung in die kristallinische Modifikation zur Diagnose. Winogradsky brachte die Fäden auf eine Minute in eine konzentrierte wässerige Pikrinsäurelösung, wusch mit viel Wasser aus, worauf sich der Schwefel innerhalb eines Tages sowohl in seiner rhombischen als in seiner monoklinen Modifikation ausschied (Fig. 19). Hinze, der die Körnchen in den Zellen von Thiophysa volutans als Schwefel identifizierte (l. c.) und überdies in den entschwefelten Thiophysen Schwefelbildner auffand, bringt die Schwefelkugeln dadurch zur Kristallisation, daß er die Präparate in reines Glyzerin einträgt; der Schwefel kristallisiert langsam in monoklinen Kristallen aus. In konzentrierter Salpetersäure erfolgt Kristallbildung schon nach einigen Stunden. Auf gleiche Weise gelang es ihm, den Nachweis zu führen, daß die „Gasvakuolen" der Oscillarien Schwefel enthalten. Diese lösen sich in absolutem Alkohol, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, wobei ein Rest ungelöst bleibt. Sie sind unlöslich in konzentrierter Pikrinsäure, verdünnter Essigsäure, verdünnter Salzsäure, 1% Chromsäure, Glyzerin, Salpetersäure, verdünnter und konzentrierter Kalilauge und in konzentrierter Schwefelsäure. Sie verhalten sich demnach ebenso wie die Schwefeltropfen der Beggiatoen. Die sogenannten Gasvakuolen wurden bereits von P. Richter[2]) für schwefelhaltig angesprochen. Später hielt sie Klebahn[3]) für Gasbläschen (Luft oder Stickstoff führend), eine Ansicht, die von Molisch durch Isolierung der Bläschen widerlegt wurde, welcher sehr kleine Körnchen in ihnen


Fig. 19. Kristallinischer Schwefel auf Beggiatoa spec. (Pikrinsäure).

[1]) O. Bütschli, Über den Bau der Bakterien und verwandter Organismen, Leipzig 1890.

[2]) P. Richter, Gloiotrichia echinulata, eine Wasserblüte des großen und kleinen Plöner Sees, Forschungsber. Plöner Station, 1894, II, S. 42.

[3]) H. Klebahn, Gasvakuolen, ein Bestandteil der Zellen der wasserblütebildenden Phycochromaceen, Flora, 1895, LXXX, S. 241 und Forschungsber. Station Plön, 1896, IV und 1897, V.

vorfand. Die Isolierung gelingt leicht, wenn man frisches Material (Aphanizomenon flos aquae) auf dem Objektträger in 10 % Kalisalpeterlösung bringt. Die Fäden zerfallen bereits nach 24 Stunden, es resultiert eine blaue Lösung (von Phycocyan), in der viele Gasvakuolen isoliert sind, besonders wenn man durch Druck (mit einem Kork) auf das Deckglas die Zellen zum Platzen bringt. Es sind demnach zähflüssige, fast weiche Körper. Molisch[1]) dachte daran, daß die „Gasvakuolen" aus einer Grundsubstanz und einem Imprägnierungskörper beständen. Läßt man nämlich auf Gloiotrichia unter Deckglas 20 % Kalilauge einwirken, dann verschwinden die „Vakuolen", bei nachfolgendem Zusatz von Methylenblau in 1 % wässerigem Ammoniak treten aber die von ihnen vordem eingenommenen Stellen blau gefärbt hervor, so daß es den Eindruck macht, „als ob die Kalilauge eine Gerüstsubstanz der „Gasvakuole" zurückgelassen hätte, die sich mit Methylenblau färbt und erst hierdurch in Erscheinung tritt." — Auf ganz andere Weise werden die Gebilde von A. Fischer gedeutet. Sie sollen das erste sichtbare Assimilationsprodukt der Oscillarien sein, Kohlehydratnatur besitzen und wurden von ihm Anabaenin (s. d.) genannt. Anabaenin ist ein Kondensationsprodukt des Glykogens.

A. Fischer weist den Schwefel in Präparaten von Chromatium, die bei Betrachtung in Luft Schwefel und Farbstoff getrennt enthalten, dadurch nach, daß er die Chromatien direkt in Kanadabalsam oder in Dammarlack legt. Schon nach 10 Minuten entfärben sich die Chromatien, und es bilden sich „rot gefärbte Schwefelkörnchen".

Der zu den unentbehrlichen Elementen zählende Schwefel steht den Pflanzen überall im Boden in Form von Salzen zur Verfügung. In den Zellen tritt er in **anorganischer** und **organischer Bindung** auf. Sind doch, wie schon Scheele wußte, die Eiweißstoffe schwefelhaltig. Die Proteine der Pflanzen haben meist 2 % Schwefel, die tierischen Keratine sind schwefelreicher (4—5 %). Tammann[2]) verfolgte den Schwefelgehalt bei der Keimung der Erbse. Nach Schulze[3]) entstehen in Keimpflanzen bei der Oxydation der primären Zersetzungsprodukte der Eiweiße Sulfate, die dann proteiden Ursprungs sind. Eiweißschwefel ist nicht nur im Samen, sondern auch im Blatte vorhanden. In einigen Fällen ist in den Blättern während der Vegetationsperiode eine Abnahme an Schwefel festgestellt worden, in anderen nicht; ob diese Abnahme eine absolute ist und in Beziehung zu den Eiweißstoffen steht, bleibt noch zu ermitteln. Durch hohen Schwefelgehalt zeichnet sich die Asche der Cruciferen aus, die (schwefelhaltige)

---

[1]) H. Molisch, Die sogenannten Gasvakuolen und das Schweben gewisser Phycochromaceen, Bot. Ztg., 1903, LXI, S. 47, und: Zwei neue Purpurbakterien mit Schwebekörperchen, Bot. Ztg., 1906, LXIV, S. 223.

[2]) Tammann, Ztschr. f. phys. Chem., 1885, IX, S. 416.

[3]) E. Schulze, Ber. deutsch. bot. Ges., 1903, XXI, S. 67.

Senföle führen (Cochlearia armoracia 17,12 %, Brassica oleracea 20 % SO_3 in der Asche). In Holz und Rinde liegen wohl überwiegend Sulfate vor. Reich an Schwefel ist der Splint im Mittel 2—4 %, bei Morus alba 9,82 %, Pinus strobus 10,29 %). Die Rinden führen meist weniger als 1 %, doch werden für Chinarinden 4—6 %, für die Borke der Fichte 6 % angegeben. Im Sekretwasser der Drüsen der Halophyten finden sich Sulfate von Kalium, Natrium und Magnesium (Schtscherback)[1]. Da die Bestimmung des Schwefels in der Asche ausgeführt wird, so wissen wir in den meisten Fällen nichts Bestimmtes über die Art der Bindung. Auch die Asche der Meeresalgen ist reich an Schwefel.

In der Nähe der Röstöfen (für Spateisenstein), die die Luft mit Schwefligsäureanhydrid erfüllen, erkranken zuweilen Pflanzen (Fichten). In der Pflanze wird die schweflige Säure zu Schwefelsäure oxydiert. In solchen Fällen kann abnorm hoher Gehalt an Schwefelsäure in den Pflanzen bei Berücksichtigung der Sulfate des Bodens als Beweis für die schädigende Wirkung der Gase dienen[2].

Der Schwefelgehalt ist überwiegend in der Asche ermittelt worden. Die mikrochemischen Methoden stützen sich im wesentlichen auf die Angaben Schimpers[3]. Viele Verbindungen der Schwefelsäure sind wasserlöslich, die zu prüfenden Schnitte dürfen somit vorher nicht gewässert haben. Hingegen kommt es in Alkohol- und Glyzerin-Präparaten und -Material bisweilen zur Ausscheidung von Sulfaten. Dabei ist zu beachten, daß Sulfate (allerdings auch Nitrate) meist schwer- oder unlöslich in 70—80 % wässeriger Chlorhydratlösung sind (Schaer)[4]. Trägt man Schnitte direkt in Baryumchlorid (1 : 10) ein, dann zeigt Bildung von rhombischen Täfelchen Baryumsulfat an. Doch fällt der Niederschlag oft nur amorph aus. Strontiumnitrat (1 : 10) bedingt die Bildung kleiner rundlich rhombischer Kriställchen von Strontiumsulfat, die in Wasser natürlich unlöslich sind.

Kalziumazetat, welches in der Chemie als Fällungsmittel benutzt wird, versagt beim Nachweis im Gewebe oft, wahrscheinlich, weil Pflanzensäuren zugegen sind.

Gola[5]) deutet die mit alkalischer Nitroprussidnatriumlösung in meristematischen Geweben (Sproß- und Wurzelspitzen,

[1]) J. Schtscherback, Ber. deutsch. bot. Ges., 1910, XXVIII, S. 30.

[2]) R. Hartig, Über die Einwirkung des Hütten- und Steinkohlenrauches auf die Gesundheit der Nadelhölzer, Forstl.-naturw. Ztschr., 1896; A. Wieler, Untersuchungen über die Einwirkung von schwefliger Säure, Berlin 1907; K. Feist, Nachweis einer Schädigung von Fichten durch Röstgase, Arch. d. Pharm., 1911, CCXLIX, S. 7.

[3]) A. F. W. Schimper, Zur Frage d. Assimil. d. Mineralsalze d. d. grüne Pflanze, Flora, 1890, LXXIII, S. 219.

[4]) E. Schaer, Neuere Beobacht. üb. Verwend. d. konz. Chloralhydratlös., Schw. Wochenschr. f. Chem. u. Pharm., 1910, XLVIII, S. 618.

[5]) G. Gola, Lo zolfo e i suoi composti nell' economia delle piante, Malpighia, 1902, XVI, S. 368.

Asparagus) eintretende Rotfärbung auf Schwefel: Moerner[1]) hatte diese Reaktion, die übrigens Haushofer[2]) ebenfalls als Schwefelreaktion empfiehlt, vorher für Cystein angegeben. Bei der Nachprüfung erwies sie sich bei Asparagus umständlich und launisch. Gleichfalls eine rote Farbenreaktion gibt die Methode von Brunner[3]), die noch zu überprüfen wäre. Die Präparate werden im Reagenzglase längere Zeit mit konzentrierter Kalilauge behandelt und geben nach Zusatz von Nitrobenzol und etwas Alkohol eine rötliche Färbung.

Der mikrochemische Nachweis nach Behrens[4]) als Kalziumsulfat, Bleisulfat und Caesiumalaun ist mit Geweben noch nicht genügend erprobt worden. Emich[5]) empfiehlt sulfidhaltige Objekte nach dem Benetzen mit Kalziumchlorid Bromdämpfen auszusetzen. Die gefällten

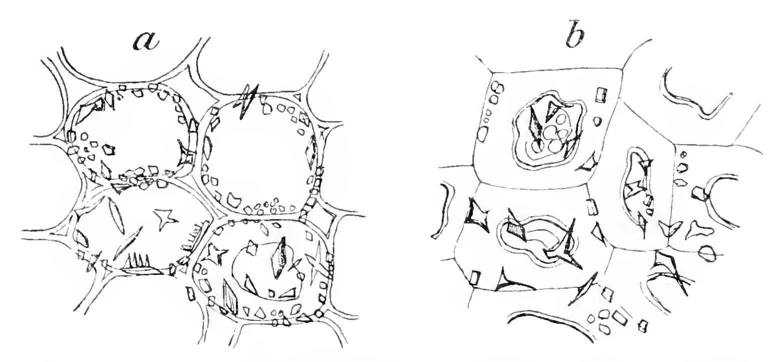


Fig. 20. Schwefelnachweis mit Baryumchlorid: *a*) Cochlearia armoracia (Wurzel); *b*) Strychnos nux vomica (Endosperm, Schnitt mit Äther entfettet, dann verd. Salzsäure, Baryumchlorid, Wasser, Chloralhydrat) (Tunmann).

Sulfide und auch freier Schwefel werden schnell oxydiert und es bilden sich Gipsnadeln. Bei der Meerrettigwurzel und bei einigen Rinden erhielt ich keine Erfolge. Durch die Bromdämpfe treten gleichzeitig die Alkoloide in Reaktion, Stärke wird gefärbt u. a.

Bei der Nachprüfung hat sich zum Nachweis im Gewebe Baryumchlorid in jeder Hinsicht als das beste Reagens bewährt (Fig. 20). Nur erhält man den Niederschlag nicht, wie Schimper angibt, in Täfelchen, sondern teils körnig, teils in langgestreckten x-förmigen Skeletten, die bei gewöhnlicher Beleuchtung wie lang ausgezogene Oktaeder aussehen.

---

[1]) Moerner, Ztschr. f. phys. Chem., 1900, XXVIII, S. 594.

[2]) K. Haushofer, Mikr. Reakt., S. 116.

[3]) Th. Brunner, Ztschr. f. analyt. Chemie, 1881, XX, S. 390.

[4]) H. Behrens, Anleit. z. mikrochem. Analyse, S. 121.

[5]) Fr. Emich, Ztschr. f. anal. Chemie, 1893, XXXII, S. 163.

Zuweilen finden sich dreieckige Täfelchen, zierliche Sternchen und isoliert liegende federartige Formen. Die Kristalle zeigen bei auffallendem Lichte hellen Fettglanz. Die gleichen Fällungen erhält man mit reinen Substanzen. Des weiteren ist zu beachten, daß Nitrate gleichzeitig gefällt werden. Die Schnitte müssen nach der Behandlung mit Baryumchlorid gut ausgewaschen werden (zur Entfernung von Baryumnitrat): sie können dann in Chloralhydrat aufgehellt werden. Nicht nur anorg. Schwefel wird auf diese Weise angezeigt, sondern auch der Schwefel der Senfoele und zuweilen (nicht immer) selbst Eiweißschwefel der Samen (Strychnos). Die aleuronhaltigen Schnitte werden mit Äther vom Fett befreit, nach dem Austrocknen auf dem Objektträger einige Zeit in wenig verd. Salzsäure (1 : 10) liegen gelassen und schließlich mit Baryumchlorid versetzt. Sind größere Schwefelmengen zugegen, wie bei Cochlearia armoracia, dann sind die Zellen mit Baryumsulfat oft ganz erfüllt: meist entstehen die Fällungen an den Zellwänden. Schimper hatte (a. a. O. S. 222) bei Samen und Knollen (Solanum) mit Baryumchlorid keine Reaktion erhalten. Betupfen der Schnitte mit einer Spur verd. Salzsäure vor dem Baryumzusatz bringt hier öfters Erfolg.

Die löslichen **Kalium-** und **Natriumsalze** der Schwefelsäure weist man mit Nickelsulfat (1 : 10) nach. Hierbei entstehen in gut ausgebildeten monoklinen Prismen auskristallisierende Doppelsalze, die sich allerdings recht leicht in Wasser lösen, so daß die Reaktion für Lokalisationsermittelungen wenig geeignet ist. Auf alle Fälle empfiehlt sich mehrtägiges Austrocknen der Objekte im Exsikkator. Verdunstet man den wässerigen Auszug der Asche, dann scheidet sich zuerst das schwerlösliche Kaliumsulfat in hexagonalen Täfelchen aus. Diese Täfelchen werden durch Baryumchlorid in farblose, durch Platinchlorid in rötliche Körnchen übergeführt. Kaliumsulfat könnte auch mit einer wässerigen Lösung von Bismarckbraun identifiziert werden; es müßten sich alsdann nach Retgers[1]) faserige, stark dichroitische Kristalle abscheiden.

Interessant ist das Vorkommen von äußerst kleinen Prismen und Täfelchen in Desmidiaceen, die nach A. Fischer aus **Kalziumsulfat** bestehen und teils in scharf begrenzten Vakuolen auftreten (in den Zellenden von Closterium), teils im Zellsaft zerstreut sind. Diese Gipskristalle lösen sich langsam in kalter Kalilauge, Salz- und Salpetersäure, sofort beim Erhitzen in diesen Reagentien. Sie sind unlöslich in Essigsäure und in kalter konzentrierter Schwefelsäure, bleiben auch

[1]) J. W. Retgers, Künstl. Färbung von Kristallen mittels organisch. Farbst., Ztschr. f. phys. Chem., 1893, XII, S. 600.

beim Glühen unverändert zurück. Baryumchlorid führt sie in Baryumsulfat über, das in Salpetersäure und in Salzsäure unlöslich ist[1]. — Die von Hansen für die großen monoklinen Kristalle in Angiopteris angegebene Gipsnatur wird von Monteverde, Belzung u. a. bestritten; es soll sich um Oxalat handeln.

Das als schwer löslich bekannte Kalziumsulfat scheint bisweilen in den Zellen in Lösung gehalten zu werden. Wenigstens sind die Sphärokristalle, die sich in Marattiaceenblättern, welche monatelang in Alkohol gelegen haben, ausscheiden, nach Monteverde[2]) Gips. Hansen findet jedoch, daß diese Ausscheidungen, die auch sechseckige Täfelchen bilden, aus Gips und aus Magnesiumsulfat bestehen. Sphärokristalle von Gips scheiden sich ferner bei Alkoholmaterial von Hebeclinium macrophyllum in den jugendlichen Holzzellen aus[3]) und Belzung[4]) traf beim Einlegen der Präparate in reines Glyzerin gelegentlich des Asparaginnachweises pinsel- und büschelartige Gipskristalle (Lupinus albus), und zwar in den Interzellularräumen an.

Zur quantitativen Bestimmung des Schwefels (und der Halogene) in kleinen Mengen organischer Substanzen hat J. Donau[5]) ein Verfahren ausgearbeitet; zur Ausführung genügen bereits 0,001—0,003 g Substanz.

Chlor.

Chloride kommen überall im Boden vor und werden von den Pflanzen aufgenommen. Mangel an Chloriden führt in vielen Fällen Störungen im Stoffwechselprozeß herbei. Für Buchweizen und einige andere Pflanzen ist Chlor völlig entbehrlich. Diese Pflanzen schreiten auch in chlorfreien Lösungen zur Samenbildung. Die Chloride wirken in bestimmten Konzentrationen als Reizmittel; werden diese überschritten, dann treten Giftwirkungen auf (P. Koenig). Meist bestimmt man den Gehalt an Chlor in der Asche. Dieser beträgt im Samen gewöhnlich 0,5—1,5 %, im Samen der Kokosnuß aber 13,42 %, der Roßkastanie 6,30 %, des Mohnes 4,58 % der Gesamtasche. Geringere Mengen Chloride kommen im Holze vor. Auch hier gibt es, abgesehen von den auf stark chloridhaltigem Boden wachsenden Pflanzen, Ausnahmen, so hat das Holz von Aesculus hippocastanum bis 6 %, das von Prunus mahaleb bis über 11 % Chlor in der Asche. Ebenso verhält es

---

[1]) Alfr. Fischer, Über d. Vorkommen von Gipskristallen bei den Desmidiaceen, Jahrb. f. wiss. Botanik, 1884, XIV, S. 133.

[2]) N. A. Monteverde, Über Kristallablagerungen bei den Marattiaceen, Bot. Zentralbl., 1886, XXXIX, S. 358.

[3]) A. Hansen, Über Sphärokristalle, Arb. d. bot. Inst. Würzburg, 1885, III, S. 92.

[4]) E. Belzung, Exist. de l'oxal. de calc. à l'état diss., Journ. d. Botan., 1894, VIII, S. 213.

[5]) J. Donau, Sitzber. Wien. Akad., 1912, CXXI, Abt. 2b, Sep.

sich mit der Rinde. Durch hohen Chlorgehalt zeichnet sich u. a. die Chinarinde und die Roßkastanie aus, in welchen er 3—5% der Gesamtasche betragen kann. Am meisten schwankt der Gehalt an Chloriden in den Blättern; man hat in der Asche mancher Blätter nur Spuren gefunden, in der anderer Blätter bis zu 25%; selbst der Chlorgehalt verschiedener Blätter der gleichen Pflanze schwankt. Der Chlorgehalt der Blätter, zu verschiedenen Zeiten bestimmt, zeigt keine Gesetzmäßigkeiten[1]). Größere Mengen finden sich in der Blüte, besonders in der Korolle. Im allgemeinen bevorzugen die Chloride nach Schimper in den Organen die grünen Gewebe. Die Blätter verschiedener Halophyten scheiden mit ihren Drüsen Chloride von Kalium, Natrium und Magnesium aus (Statice, Tamarix, Frankenia), wie in letzter Zeit von Schtscherback[2]) von neuem auf mikrochemischem Wege gezeigt wurde.

Der mikrochemische Chlornachweis im Gewebe wurde von Schimper[3]) studiert, der Silbernitrat und Thalliumsulfat erprobte. Die Objekte dürfen zuvor nicht gewässert haben. Beim Nachweis mit Silbernitrat (1 : 20) schreibt Schimper vor, die Schnitte unter Deckglas mit dem Reagens zu versetzen, eintrocknen zu lassen und den entstandenen amorphen Niederschlag von Chlorsilber in einer Spur Ammoniak zu lösen. Man läßt wiederum eintrocknen und erhält nun Kristalle. Dieses zweimalige Eintrocknenlassen der Schnitte ist aber nicht nötig. Es empfiehlt sich folgender Gang: Die Schnitte, die mit einem reinen Messer angefertigt sind, werden auf $^1/_4$—1 Stunde in einen Tropfen Silbernitrat gelegt, ohne mit dem Deckglase bedeckt zu werden. Bei Gegenwart größerer Mengen Chlor sind die Fällungen makroskopisch sichtbar. Sie erscheinen käsigweiß, wenn man den Objektträger über eine weiße Unterlage hält, bei mikroskopischer Betrachtung fast schwarz und flockig bis körnig, doch auch bräunlich und gallertförmig, hautartig (Laminaria). Nach Bildung des Niederschlages wird ein Schnitt mit einem fein ausgezogenen Glasstäbchen aus der Silberlösung herausgenommen, auf einem zweiten Objektträger direkt in verdünnte Salpetersäure eingelegt und das Deckglas aufgelegt. Das Chlorsilber bleibt ungelöst, doch werden stärkehaltige Präparate weitgehend aufgehellt. Auf die anderen noch in der Silberlösung liegenden Schnitte wird Ammoniak bis zur Lösung des Niederschlages zugesetzt und das Deckglas aufgelegt. Innerhalb einiger Stunden hat sich das Chlorsilber nun in kristallinischer Form ausgeschieden. Man wird finden, daß die Ausscheidung bereits vollendet ist, wenn noch der halbe Raum unter dem Deckglas mit Flüssigkeit erfüllt ist. Die Ammoniakgase sind

[1]) J. Vandevelde, Bull. Soc. Chim. Belg., 1909, XXIII, S. 84.

[2]) J. Schtscherback, Ber. d. bot. Ges., 1910, XXVIII, S. 30.

[3]) A. F. W. Schimper, Zur Frage d. Assimilation d. Mineralsalze d. die grüne Pflanze, Flora, 1890, LXXIII, S. 217.

nämlich verdunstet, und Chlorsilber ist in der restierenden wässerigen Flüssigkeit unlöslich. Ein vollständiges Eindunsten der Lösung ist daher nicht erforderlich. Nur ein Teil der Kristalle entsteht in den Zellen. Ganz überwiegend sind es Kristalle von 10—25 μ Größe, reguläre Würfel, Oktaeder, Rhombendodekaeder und Kombinationen. Sie liegen einzeln oder zu Gruppen vereint. Besonders häufig sind Gruppen von 4 Kristallen (Würfel und Oktaeder). Nach längerer Zeit entstehen außerdem bis 70 μ große Kristalle von flacher tafelförmiger Gestalt (Fig. 21). Die Kristalle werden nach einigen Stunden tiefviolett bis schwarz, die großen Kristalle veilchenblau. Die Reduktion erfolgt bei den verschiedenen Objekten in verschieden langer Zeit (auch beim Liegen der Schnitte im Dunkeln), bei Laminaria in 10 Minuten, bei Daucus carota nach mehreren Stunden. Das Silberchlorid, sei es amorph oder kristallinisch, löst sich leicht in konzentrierter Quecksilbernitratlösung, Natriumhyposulfit, Ammoniak, Cyankalium, ist aber in verdünnten Säuren unlöslich. Die Kristalle leuchten im polarisierten Lichte nicht auf. Dem Chlorsilber in der Kristallform ähnlich sind die durch Silbernitrat entstehenden Fällungen der Arsenite und Arsenate. Gerade die aus 4 Kristallen bestehenden Gruppen sind für arsenigsaures Silber ebenfalls typisch. Bei Wasserpflanzen (Meeresalgen) ist die Gegenwart größerer Mengen von Arsenverbindungen nicht völlig ausgeschlossen. In zweifelhaften Fällen werden die Chlorsilberkristalle noch nach Borodin identifiziert. Chlorsilberkristalle müssen in einer konzentrierten Lösung von Chlorsilber in konzentrierter Salzsäure oder in Kochsalzlösung an Größe zunehmen. — Jederzeit zur Verfügung stehende Versuchsobjekte sind: Laminaria Cloustoni (Droge), Daucus carota (Wurzel), Beta, Solanum u. a.

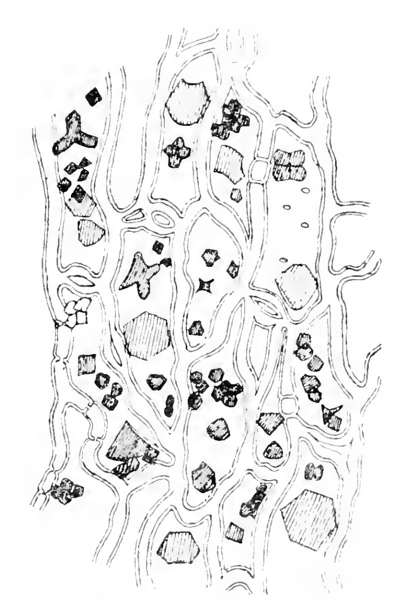


Fig. 21. Laminaria Cloustoni (Längsschnitt), Chlornachweis mit Silbernitrat und Ammoniak (Tunmann).

Außerdem läßt sich eine Lösung von Thalliumsulfat[1]) benutzen. Die Präparate werden direkt in das Reagens eingetragen. Nach

[1]) K. Haushofer, Mikr. Reaktionen, 1885, S. 125.

einiger Zeit, zuweilen erst beim Eintrocknen, scheidet sich Thalliumchlorür in den Zellen in Oktaedern und in undeutlich ausgebildeten Kristallen des regulären Systems mit unebener, grubig punktierter Oberfläche aus, die in auffallendem Lichte grauweiß, in durchfallendem Lichte schwarz erscheinen. Diese Eigenschaft läßt sich zum Auffinden der Fällungen in Geweben verwerten, indem man den Spiegel ab- oder horizontal stellt. Öfters entstehen körnige Gebilde, die nur wenige μ groß werden. Schöne Kristallformen erhält man bei Meeresalgen, bei Chondrus crispus bis 25 μ große Würfel (Fig. 22). Die Kristalle lösen sich in Wasser und nehmen bei der Prüfung nach Borodin auf Zusatz einer konzentrierten wässerigen Lösung von Thalliumchlorür an Größe zu.

Zum mikrochemischen Nachweis der Chloride in der **Asche** zieht man die Asche mit etwas warmem Wasser aus und bringt an verschiedenen Stellen des Objektträgers, am besten in der Nähe der Ecken, einige Tropfen des Auszuges zur Verdunstung. Entstehung regulärer Würfel im Rückstand deutet auf Chlorkalium oder Chlornatrium hin. Auch in Milchsäften oder in dem ausgepreßten Saft frischer Pflanzen kann man durch Eintrocknenlassen die Chloride zur Kristallisation bringen. Als Vorprobe auf wasserlösliche Kristalle benutzt man eine 70—80 % wässerige Chloralhydratlösung. Im allgemeinen sind die Chloride (auch Bromide und Jodide), die Phosphate und die Salze organischer Salze leicht in der hochprozentigen Chloralhydratlösung löslich, die Nitrate und Sulfate aber fast unlöslich. Auch wenn es sich um kristallinische Ausscheidungen in Alkoholmaterial handelt, gibt die Chloralhydratlösung Anhaltepunkte. — Über den Nachweis der Alkalimetalle in diesen Kristallen siehe unter Natrium, Kalium u. f.



Fig. 22. Chondrus crispus, Chlornachweis mit Thalliumsulfat (Tunmann).

Jod.

Jod ist, wenn auch nur in Spuren, weit verbreitet; es findet sich im Meerwasser (1 : 300000), in Mineralquellen (Vauquelin, Liebig), in der Ackererde und im Regenwasser (Bourcet), sowie in den in der Luft schwebenden Staubteilchen (Gautier). So ist es erklärlich, daß Jod in neuerer Zeit makrochemisch in vielen Pflanzen aufgefunden wurde (in Süßwasseralgen, Flechten, in Land-

pflanzen besonders in stärkearmen Knollen und Wurzeln, in Knospen und krautigen Stengeln, Gautier). Durch hohen Jodgehalt sind die Meeresalgen ausgezeichnet, besonders die Laminarien, aus deren Asche man lange Zeit hindurch Jod ausschließlich gewann. Dies geschieht in Japan noch jetzt. Der Jodgehalt japanischer Algen ist hoch (Fucus vesiculosus 0,741, F. serratus, 0,7965, F. digitatus 1,2012, Laminaria saccharina 0,4174 %, Ossendowski). Laminaria Cl. von Helgoland zeigte große Schwankungen (0,096, 0,059, 0,108 % im Stengel, 0,143, 0,071, 0,124 % im Blatt, Tunmann). Von verschiedener Seite wird angenommen, daß alle pflanzlichen und tierischen Zellkerne jodhaltig sind, und aus Badeschwämmen (Kalifornien) haben 1910 Wheeler und Mendel ein 3,5-Dijodtyrosin isoliert. In den Laminarien sollen nach Eschle (1897) ausschließlich organische Jodverbindungen vorkommen, die nur zum kleinen Teile in Wasser, Alkohol, Azeton, Alkalien und Säuren löslich sind. Van Itallie (1889) nimmt die Gegenwart von Jodiden an, und nach eigenen Erfahrungen dürfte ein Teil des Jods sicher als Jodid vorliegen.

Makrochemisch gelang Flückiger[1]) der Jodnachweis noch mit 0,1 % der Laminariadroge. Er röstete die gepulverte Substanz unter Zusatz der doppelten Menge Bimsstein vorsichtig bis zur Verkohlung, nahm die Masse mit Wasser auf und wies das Jod im Filtrat, nach Ansäuern mit Eisenchlorid, durch Ausschütteln mit Schwefelkohlenstoff nach, der sich violett färbte. In ähnlicher Weise konnte van Itallie[2]) in 10 g Chondrus crispus den Jodnachweis erbringen und zwar in den mit Wasser und 50 % Alkohol erhaltenen Auszügen.

Einfacher und sicherer ist bei Laminaria der mikrochemische Nachweis. Den in Wasser liegenden Präparaten fügt man einige Stärkekörnchen zu und läßt vom Deckglasrande 1—2 Tropfen Eisenchlorid[3]) (offizinelle Lösung) einwirken. An zweiter Stelle kann konzentrierte Salpetersäure[4]) benutzt werden. (Die Reagentien sind vorher auf Reinheit — Jod und Jodsäure — zu prüfen.) Es ist ratsam, mehrere Präparate, welche aber ganz zart sein können, unter ein Deckglas zu

[1]) F. A. Flückiger, Nachw. d. Jods in Laminaria, Arch. d. Pharm., 1887, CCXXV, S. 519.

[2]) L. van Itallie, Über das Vorkommen von Jodium in Fucus vesiculosus und Chondrus crispus, Arch. d. Pharm., 1889, CCXXVII, S. 1132.

[3]) Tunmann, Über das Jod und den Nachweis desselben in der Laminaria. Pharm. Zentralh., 1907, XLVIII, S. 505.

[4]) Nach Tschirch (Handbuch, Anmerkungen) soll Price Jod „mittels HCl und KNO_2 und Stärkekleister" nachgewiesen haben. Diese Reaktion ist für mikroskopische Schnitte nicht zu empfehlen; sie mißlingt gewöhnlich. Der Stärkekleister färbt sich durch die starke Säureentwicklung rasch rot (Amylodextrin), die Jodbläuung tritt nicht klar hervor, bleibt auch ganz aus; wahrscheinlich entweichen die Spuren Jod bei der intensiven Reaktion am Deckglasrande. Das Reagens schädigt leicht die Linsen.

bringen. Das frei gewordene Jod färbt die Stärkekörner tief blau, die schönste Färbung zeigen die nahe dem Deckglasrande liegenden Körner. Die Reaktion, die innerhalb $^1/_4$ Stunde den Höhepunkt erreicht, tritt noch mit 0,001 g der Droge ein und mit 0,01 g lebenden Materials. Bei Benutzung von 0,01 g Droge und Anwendung reichlicher Stärke ist die Blaufärbung mit bloßem Auge wahrnehmbar. Unter Berücksichtigung der mit gleichem Material ausgeführten quantitativen Bestimmungen und der Vergleichsversuche mit Kaliumjodidlösungen von bestimmtem Gehalt gelingt es mit dieser Methode noch 0,0005 mg Jod nachzuweisen. Der Nachweis gelingt auch mit 0,02 g des aus der Schnittfläche eines gut gereinigten frischen Laminariastengels austretenden Schleimes. Frisches Material ist gut vom (jodhaltigen) Meerwasser zu befreien. Die die Reaktion bedingenden Jodverbindungen lassen sich innerhalb 24 Stunden mit Wasser oder Alkohol den Geweben (Schnitten) entziehen. Bei Florideen (Chondrus crispus, getrocknetes Material, Droge) trat die Reaktion nicht immer ein und nur bei Anwendung von Präparaten im Gesamtgewicht von 0,5—1,0 g. Die Jodamylumreaktion gibt nur bei jenen Pflanzen positive Resultate, bei denen die Jodverbindungen in relativ größerer Menge vorhanden sind.

Justus[1]) hat Jod in den Zellkernen der Knospen von Fraxinus nachgewiesen. Die Präparate des in Alkohol fixierten und in Celloidin eingebetteten Materials werden durch Waschen mit Wasser vom Alkohol befreit und 1—2 Minuten mit Chlorwasser behandelt, um das Jod in jonisiertes Jod überzuführen. Nun kommen die Schnitte auf mehrere Stunden in eine 0,01 % Silbernitratlösung, dann wird durch 24stündige Mazeration mit konzentrierter Kochsalzlösung das Silberchlorid ausgewaschen. Nachdem man die Präparate mit Wasser abgespült hat, gelangen sie in eine 3—5 % Quecksilberchloridlösung, um das Silberjodid in rotes Quecksilberjodid überzuführen, welches in konzentriertem Glyzerin (mehr oder weniger gut) sichtbar ist. Das Verfahren lieferte bei der Laminaria brauchbare Resultate, doch erschien es vorteilhaft, das Auswaschen mit der Kochsalzlösung 2 Tage lang fortzusetzen und die Lösung einmal zu erneuern. Auch erwies sich eine 2 % Quecksilberchloridlösung am geeignetsten. Stärkere Sublimatlösungen geben mehr chromgelbe Färbungen. Die Zellwände blieben farblos, die Chromatophoren zeigten die besten Färbungen, weniger gut bei Fucus Zellkern und Plasma. Wenn sich das Jod bei dieser Reaktion auf organisierte Zellbestandteile niederschlägt, so ist dies noch kein einwandfreier Beweis für eine Lokalisation des Jods in Zellkern

[1]) J. Justus, Über den physiologischen Jodgehalt der Zelle, Virchows Arch. 1902, CLXX, S. 501.

und Chromatophor, zumal sich aus den Präparaten der Laminaria das Jod mit Wasser und Alkohol ausziehen läßt und, wie wir oben sahen, der austretende Schleim Jodreaktion gibt.

In Bonnemaisonia asparagoides hat Golenkin[1]) Zellen nachgewiesen, welche in der Rinde jüngerer Sprosse vorkommen und die Cystocarpien bedecken. Diese Zellen enthalten eine große stark lichtbrechende Vakuole, die mit Cyanin intensiv braun wird und somit eine Jodverbindung enthalten soll, denn Jodlösungen geben nach makrochemischen Versuchen mit Cyanin einen braunen, in Wasser sehr schwer löslichen Niederschlag, der aber sehr unbeständig sein soll. Größeres Gewicht ist auf den Befund zu legen, daß diese Alge Stärkekleisterpapier bläut, vorausgesetzt, daß diese Reaktion auch bei gut gereinigten Objekten eintritt.

Stickstoff (Salpetersäure).

Als Stickstoffquellen für die Eiweißproduktion dienen den Pflanzen Ammoniumverbindungen, in bestimmten Fällen der Stickstoff der Luft, vor allem aber die Nitrate des Bodens. Nitrite, die sich zwar beim Mais den Nitraten gegenüber als gleichwertige Düngungsmittel erwiesen [2]), sind für keimende Samen mehr oder weniger giftig. Ältere, aber noch in Entwicklung begriffene Pflanzen sind gegen mäßige Nitritmengen unempfindlich [3]). Die Nitrate gelangen aus dem Boden in die Leitungsbahnen und werden bei der Eiweißsynthese verarbeitet, wahrscheinlich, doch nicht ausschließlich, in den Blättern, nach Schimper in den Chlorophyllkörnern. In den Wurzeln ist die Nitratreaktion einige Millimeter oberhalb der Wurzelhaarzone noch gut zu erhalten. Doch dringen die Nitrate nicht so schnell in die Wurzelhaare ein, wie einige Farbstoffe (Methylviolett)[4]). Im Mesophyll der Blätter sind die Nitrate nur schwer nachweisbar, gut jedoch in dem chlorophyllarmen Leitparenchym (Blattnerven, Rindenparenchym, Mark). Im Samen fehlen sie (Schimper). Typische Salpeterpflanzen (in erster Linie zu mikrochemischen Studien geeignet) sind Zea mays, Phaseolus multiflorus, Cucurbita pepo, Helianthus annuus, ferner Beta vulgaris, Solanum tuberosum, Solanaceen (Atropa belladonna, Datura), viele Boragineen und nach Lutz Urticaceen, Chenopodiaceen, nicht Malvaceen und Kryptogamen (Moose).

Zur Untersuchung ist tunlichst lebendes Material heranzuziehen,

[1]) M. Golenkin, Algologische Notizen, Bull. d. l. Soc. Impér. d. Naturalistes d. Moscou 1894 nach Ztschr. f. wiss. Mikr., 1894, XI, S. 533.

[2]) Th. Schloesing fils, Nitrates et Nitrites pour engrais, Compt. rend., 1905, CXLI, S. 745.

[3]) A. Stutzer, Wirkung von Nitrit auf Pflanzen, Journ. f. Landw., 1906, LIV, S. 125.

[4]) L. Kny, Über den Ort der Nährstoffaufnahme durch die Wurzel, Ber. deutsch. bot. Ges., 1898, XVI, S. 216.

da der Nitratgehalt beim Trocknen, wie Couperot[1]) zeigte, infolge enzymatischer Prozesse um $^1/_3$, selbst um $^1/_2$ abnimmt. Von den zahlreichen in der Chemie benutzten Reaktionen auf Salpetersäure und Nitraten hat sich in der Pflanzenmikrochemie die Reaktion mit Diphenylamin am meisten bewährt. Zum Nachweis wird eine Lösung von 0,05—0,1 g Diphenylamin in 10,0 g konzentrierter Schwefelsäure benutzt (Molisch)[2]). Die frischen Schnitte kommen direkt in das Reagens oder aber man läßt die Präparate zuvor auf dem Objektträger eintrocknen und fügt dann das Reagens zu. Bei Gegenwart von Nitraten erfolgt sofort Blaufärbung, die nach kurzer Zeit in ein schmutziges Braungelb übergeht. Eingehend wurde die Reaktion von Müller[3]) und Serno[4]), speziell zur Unterscheidung von Kaliumnitrat und Asparaginkristallen, benutzt. Letzterer wandte eine 2%ige Lösung von Diphenylamin an. Die konz. Schwefelsäure zerstört die Präparate ziemlich schnell, um sie länger zu erhalten, kann man eine etwas verdünnte Säure anwenden, etwa drei Teile Säure und ein Teil Wasser, bei stärkerer Verdünnung tritt nach eigenen Befunden aber keine Reaktion mehr ein. Gegen die Diphenylamin-Reaktion hat man, vorzüglich in der botanischen Literatur, geltend gemacht, daß sie auch zugleich salpetrige Säure und Nitrite anzeige, daß aber letztere in den Pflanzen nicht vorkommen. Nun hat jedoch Soltsien[5]) gezeigt, daß die Reaktion gar nicht durch salpetrige Säure und Nitrite veranlaßt werden kann. Im Gegenteil vermag die Gegenwart von viel salpetriger Säure neben Spuren von Salpetersäure sogar das Eintreten der Reaktion zu verhindern. Das gleiche läßt sich, wie schon hier bemerkt sei, bezüglich der Brucinreaktion sagen. Was nun das Vorkommen von Nitriten in Pflanzen anlangt, so sind wir hierüber noch ganz im unklaren. Allerdings soll sich in Pflanzen der durch Cholera verseuchten Gegenden ein sehr hoher Gehalt an salpetriger Säure ermitteln lassen, ebenso in einigen Bakterien (Cholerabazillus)[6]). Im normalen Lebensprozeß hat man aber Nitrite noch nicht gefunden, jedenfalls nicht mit genügender Sicherheit. Im Saft der Fuchsienstengel und im Stengel-

[1]) Couperot, Compt. rend., 1909, CXLIX, S. 957.

[2]) H. Molisch, Über den mikrochem. Nachweis von Nitraten und Nitriten in der Pflanze mittels Diphenylamin oder Brucin, Ber. deutsch. bot. Ges., 1883, II, S. 150.

[3]) C. O. Müller, Ein Beitrag zur Kenntnis der Eiweißbildung in der Pflanze, Dissertation, Leipzig 1886.

[4]) Serno, Über das Auftreten und das Verhalten der Salpetersäure in den Pflanzen, Landw. Jahrb., 1889, S. 877.

[5]) P. Soltsien, Pharm. Ztg., 1906, LI, S. 765.

[6]) Mazé, Compt. rend., 1911, CLII, S. 1624.

saft von Urtica[1]) wurden Nitrite angegeben. Es fragt sich indessen, ob die Nitrite sich nicht erst infolge enzymatischer Prozesse beim Austritt aus den Zellen bildeten. Wenigstens geben Querschnitte von Urtica mit essigsaurer Antipyrinlösung keine Nitritreaktion. Auch ist die Annahme berechtigt, daß in den Pflanzen Substanzen vorkommen, die unter gewissen Bedingungen salpetrige Säure liefern. So fand Betting[2]) in frischen Blättern von Erythrina neben der von Weehuizen[3]) ermittelten salpetrigen Säure auch Azeton.

Bei Pflanzensäften wird man zum Nitritnachweis die Jodstärkereaktion heranziehen. Diese wird allerdings durch Ferrisalze und Wasserstoffsuperoxyd verhindert, ist aber ungemein scharf (noch 0,0025 μg in 100 g Wasser sind nachweisbar). Man mischt frisch bereiteten Jodstärkekleister mit der zu prüfenden Flüssigkeit und säuert mit verdünnter Schwefelsäure an (Blaufärbung). Ein sehr empfindliches Reagens auf Nitrite hat Dané[4]) angegeben. Das Reagens besteht aus einer Lösung von 0,02 g synthetischem Indol in 150 ccm 95 % Alkohol. Bei Anwesenheit von Nitriten tritt bei Zusatz des Reagens und 50 % Schwefelsäure eine rosarote bis rote Färbung auf. Die Reaktion ist noch bei einer Verdünnung von 1 : 2,5 Mill. zu erkennen und eignet sich zum Nachweis von Nitrit in Schwefelsäure und anderen Reagentien. In der Pflanzenasche beweist die Gegenwart von Nitrit, daß in der Pflanze Nitrate vorhanden waren, die durch die Kohle reduziert worden sind.

Blaufärbung mit Diphenylamin geben noch verschiedene Sustanzen, wie Bromsäure, Jodsäure, Wasserstoffsuperoxyd, chromsaures Kali, Eisenoxydsalze. Mangansuperoxyd, chlorsaures Kali[5]). Diese sind praktisch nicht von Belang, da sie weniger in Pflanzen auftreten. Anderseits wird die Reaktion durch noch unbekannte Substanzen und Ursachen zuweilen verhindert. So fanden schon Molisch und Schimper[6]), daß verholzte Elemente keine Blaufärbung geben, auch wenn sie einen großen Nitratgehalt aufweisen. In solchen Fällen kommt man, wie Ellram[7])

[1]) R. S. Tjaden Moddermann, Chem. Centralbl., 1888, I, S. 377. — Giustiniani, Chem. Centralbl., 1896, I, S. 930.

[2]) H. Wefers Betting, Pharm. Weekbl., 1909, XLVI, S. 1089.

[3]) J. Weehuizen, Über salpetrige Säure in Erythrina, Pharm. Weekbl., 1907, XLIV, S. 1229.

[4]) Dané, Einfaches Verfahren zum Nachweis der Nitrite, Bull. de la Soc. chim. de France, 1911, IX, S. 354.

[5]) B. Frank, Unters. über die Ernährung der Pflanze mit Stickstoff, Landwirtsch. Jahrb., 1888, XVII, S. 421 und Bemerkungen hierzu, S. 723; ferner Kreusler, Zum Nachweis von Nitraten im Erdboden, Landwirtsch. Jahrb., 1888, XVII, S. 721.

[6]) A. F. W. Schimper, Flora, 1890, LXXIII, S. 218.

[7]) W. Ellram, Über den mikrochemischen Nachweis von Nitraten in den Pflanzen, Dorpater Sitzber., 1895, XI, Bot. Zentralbl., 1896, LXVII. S. 74.

zeigte, der ebenfalls die Diphenylreaktion für die beste hält, zum Ziele, wenn man vor der Ausführung der Diphenylaminprobe erst die Ligninreaktion mit Phloroglucin-Salzsäure ausführt. Auch in chlorophyllhaltigen Geweben soll die Reaktion oft ausbleiben, selbst bei Anwesenheit reichlicher Nitratmengen (Lutz)[1].

Allgemein benutzt wird ferner die ebenfalls von Molisch in die Mikrochemie eingeführte Reaktion mit Brucin-Schwefelsäure, einer Lösung von 0,2 g Brucin in 10 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure. Nitrathaltige Zellen werden intensiv rot gefärbt. Die Färbung verblaßt nach einiger Zeit. Die Reaktion ist nicht so scharf wie die Diphenylaminprobe.

Arnaud und Padé[2]) benutzten zum Nachweis Cinchonamin. Sie legten die Schnitte in eine mit Salzsäure angesäuerte 0,4%ige wässerige Lösung von salzsaurem Cinchonamin. In Nitrat-Zellen gelangen Kristalle von salpetersaurem Cinchonamin zur Abscheidung (rechtwinklige, sechsseitige Täfelchen, Behrens). Auch R. Brauns[3]) erbringt den Nitratnachweis durch kristallinische Abscheidungen. Die Präparate werden auf dem Objektträger direkt in einen Tropfen wässeriger Baryumchloridlösung gelegt. Es scheiden sich nach Erwärmen auf dem Wasserbade reguläre Oktaeder von Baryumnitrat aus, welche gewöhnlich auf einer Oktaederfläche aufliegen und somit einen drei- oder sechseckigen Umriß zeigen. Doch muß erst erprobt werden, ob sich die Reaktion auch für pflanzliche Gewebe eignet. Jedenfalls müßten die Fällungen weiter identifiziert werden, da wir mit der Gegenwart von Sulfaten rechnen müssen. Zu versuchen wäre auch das Reagens von Busch[4]) Nitron oder Diphenylanilodihydrotriazol (bei Zusatz von Essigsäure Bildung langer feiner Nadeln). Fluri[5]) hat bei Anwendung einer 10%igen Nitronlösung in 5%iger Essigsäure weiße Nadeln erhalten. Diese Versuche erstrecken sich aber nur auf Spirogyren, die mit Salpeter plasmolysiert waren. Die Niederschläge entstanden nur in der Salpeterlösung, niemals in den Zellen.

---

[1]) L. Lutz, Sur l'accumulation des nitrates dans les plantes parasites et saprophytes et sur l'insuffisance de la diphénylamine sulfurique comme réactif microchimique de ces substances, Bull. Soc. bot. France, 1909, XLV, S. 104.

[2]) A. Arnaud und L. Padé, Rech. chim. de l'acide nitrique, des nitrates dans les tissus végétaux, Compt. rend., 1884, XCVIII, S. 1488.

[3]) R. Brauns, Eine mikrochemische Reaktion auf Salpetersäure, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1896, XIII, S. 207.

[4]) P. Busch, Chem. Centralbl., 1905, I, S. 900 und: Die Fällung der Salpetersäure mittels Nitron, Ztschr. f. analyt. Chem., 1909, XLVIII, S. 375.

[5]) M. Fluri, Der Einfluß von Aluminiumsalzen auf das Protoplasma, Flora, 1908, XCIX, S. 85.

Methodische Untersuchungen fehlen somit noch. Zu beachten wäre bei der Reaktion, daß nach Visser[1]) auch salpetrige Säure, Chlorsäure, Perchlorsäure, Oxalsäure und Salizylsäure kristallinische Nitronniederschläge geben.

Gewiß ist das Bestreben. Farbenreaktionen durch Reaktionen mit kristallinischen Fällungen zu ersetzen, sehr lobenswert. Doch stehen die bisherigen Erfolge in dieser Hinsicht den Farbenreaktionen an Schärfe nach. Als Hilfsreaktion läßt sich übrigens die Farbenreaktion mit Arbutin-Schwefelsäure[2]) anwenden. Allerdings wird hierbei nur noch 0,1 mg Salpetersäure angezeigt. Die Präparate werden mit einer Arbutinlösung (einer frisch mit warmem Wasser bereiteten konz. wässerigen Lösung von Arbutin) gut durchfeuchtet und dann unter Deckglas gebracht. Auf Zusatz von konz. Schwefelsäure entsteht in nitrathaltigen Zellen eine starke chromgelbe Färbung. Die Reaktion tritt nicht immer ein, aus ihrem Ausbleiben darf nicht auf die Abwesenheit von Nitraten geschlossen werden. Bei den Farbenreaktionen empfiehlt es sich, stets Vergleichspräparate zu durchmustern, denen man nur Schwefelsäure zusetzt. Denn ein Mangel der genannten Reaktionen besteht darin, daß Schwefelsäure allein bekanntlich häufig Farbenreaktionen im Gewebe hervorruft, beispielsweise bei Anwesenheit von Alkaloiden, ein Umstand, der vornehmlich bei der Brucin- und bei der Arbutin-Reaktion zu berücksichtigen ist.

Kaliumnitrat kommt sehr häufig im Gewebe vor und ist nach dem Gesagten leicht nachzuweisen. Die Schnitte kommen auf dem Objektträger in etwas Alkohol. Nach Verdunsten des Alkohols scheiden sich die Salpeterkristalle in rhombischen Tafeln, zuweilen auch in Prismen aus (Abb. unt. Asparagin). Beim Einlegen der Objekte in Glyzerin erfolgt die Ausscheidung nach Belzung (S. 75, Anm. 4) auch in den Interzellularräumen. Die Kristalle werden auf Salpetersäure mit Diphenylamin-Schwefelsäure oder in anderer Weise geprüft, der Kaliumgehalt wird mit Platinchlorid ermittelt (s. Kalium).

Die in neuester Zeit von Schmidt und Lumpp[3]) als sehr empfindlich empfohlene Reaktion mit einer Lösung von Di-(9,10-monoxyphenanthryl-)amin in konzentrierter Schwefelsäure (1 : 10) erwies sich bei einigen Versuchen nicht

---

[1]) H. L. Visser, „Nitron" als mikrochemisches Reagens, Chem. Weekbl., 1906, III, S. 743 (Chem. Centralbl., 1907, I, S. 302).

[2]) Makrochemisch mit reinen Substanzen von C. Reichard (Chem. Ztg., 1906, XXX, S. 65), mikrochemisch im Gewebe in einigen Fällen von O. Tunmann erprobt (Pharm. Centralh., 1906, XLVII, Nr. 46).

[3]) J. Schmidt und H. Lumpp, Neue sehr empfindliche Farbenreaktion zum Nachweis von Salpetersäure und Nitraten, Ber. chem. Ges., 1910, XLIII, S. 794. Das Reagens ist gebrauchsfertig von Kahlbaum, Berlin zu beziehen.

sehr brauchbar, da der Übergang der blauen Färbung des Reagens in die blaustichig rote bis weinrote Farbe bei Gegenwart von Nitraten unter dem Mikroskop nicht augenfällig in Erscheinung tritt.

Phosphor.

Phosphor tritt in den Pflanzen teils in anorganischer (Phosphate), teils in organischer (Eiweißverbindungen, Nukleoproteide, s. d.) Bindung auf. Phosphate können in der Pflanze auch bei der Zersetzung organischer Phosphorverbindungen entstehen. Überwiegend stammen sie aus dem Boden. Die Phosphate des Bodens sind für die Pflanzen unentbehrlich; sie nehmen an dem Aufbau der plasmatischen Gebilde (Zellkern, Stroma) in hervorragendem Maße teil. Den Wurzeln stehen im Boden leicht und schwer lösliche Phosphate zur Verfügung. Im Holz erreicht der Phosphorsäuregehalt im Mai zur Zeit der größten Wachstumstätigkeit sein Maximum; im allgemeinen enthält die Holzasche 3—6 %. Abnorm hohe Werte zeigt die Asche von Tectona grandis L. (29 %) und von Quercus (22 %). Die Asche der Rinden führt nur geringe Mengen Phosphor (Ausnahmen: Birkenrinde 12 %, Chinarinde bis 18 % Phosphorsäureanhydrid u. a.). In den Blättern lassen sich im Mesophyll und in den Palisaden nur geringe Mengen Phosphate nachweisen. Große Quantitäten finden sich im Leitparenchym der Blattnerven. Wahrscheinlich ist im Blatte die Phosphorsäure in organischer Bindung zugegen. Die Blattasche hat einen Gehalt von 10—15 %, zuweilen bis zu 30 % an Phosphorsäureanhydrid. Zum Herbst erfolgt eine Rückwanderung der Blattphosphorsäure in den Stamm, doch kommt es nicht zu einer Entleerung der Blätter. Am größten ist der Gehalt in den Samen, in denen er 40—50 % der Reinasche beträgt. Die Samenschalen sind arm an Phosphorsäure. Im Samen ist die Art der Speicherung der Nährstoffe (Aleuron, Fett, Stärke) nicht von Einfluß auf den Gesamtgehalt an Phosphor. Die Phosphorsäure ist dort fast nur in organischer Bindung zugegen, in Wurzeln und Rhizomen hingegen vorzugsweise als Phosphat. Die Leitung der Phosphate findet in dem chlorophyllarmen Mark- und Rindenparenchym der Wurzel und Stengel, sowie im Nervenparenchym der Blätter statt. In den Siebröhren werden organische Phosphorverbindungen geleitet. Bemerkt sei schließlich, daß von Stoklasa (Ber. bot. Ges., 1909, XXVII, S. 10) ein Phosphorgehalt des Chlorophylls (als Glyzerin-Phosphorsäure) auch in neuester Zeit angegeben wird.

Zum mikroskopischen Nachweis des Phosphors in Phosphaten benutzte Hansen[1]) eine salpetersaure Lösung von Ammoniummolybdat, die in der Chemie und in der Mineralogie schon lange zu gleichem Zwecke gebraucht wurde. Benutzt wird eine Lösung von 1,0 g molybdänsaurem Ammon in 12,0 ccm Salpetersäure (spez. Gew. 1,18). Es entsteht eine gelbliche Fällung von Ammoniumphosphormolybdat, die zuweilen kleinkörnig ausfällt, meist aber reguläre Kristalle, (5—10 μ groß, Kombinationen von Würfel und Oktaeder) bildet (Fig. 23b).

[1]) A. Hansen, Über Sphärokristalle, Arb. aus dem bot. Institut Würzburg, 1885, III, S. 95.

Die Fällung löst sich in Ammoniak. Bei Beginn ihrer Ausbildung sehen die Kristalle wie kleine gelbe Fetttröpfchen mit schwarzem Rand aus, dann wie Sphärokristalle mit zentralem Kern; eine kristallinische Struktur ist im gewöhnlichen Lichte erst nach einer Stunde wahrnehmbar. Die Reaktion, die oft erst nach einigen Stunden eintritt, kann durch die Gegenwart einiger organischer Verbindungen (weinsaure Salze) verhindert werden. Auch in Lösung befindliche Kieselsäure wird mitgefällt. Diese ist bei manchen Objekten nicht ausgeschlossen (Equiseten, Bambusen). Bei Präparaten, die stark verkieselte Membranen besitzen, verfährt man, um ganz sicher zu sein, in folgender Weise: Einige Präparate werden auf dem Objektträger mit einigen Tropfen Wasser ausgezogen, die Präparate werden beiseite geschoben,

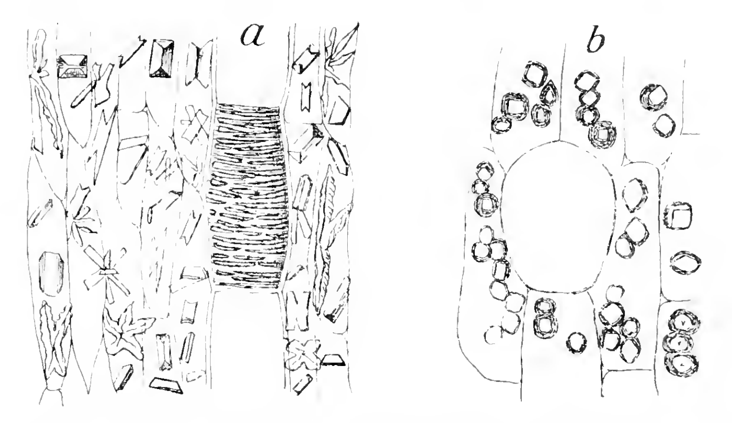


Fig. 23. Phosphornachweis; *a*) Cochlearia armoracia (Wurzel, Längsschnitt) mit Ammoniak; *b*) Althaea officinalis (Wurzel, Längsschnitt) mit Ammoniummolybdat (Tunmann).

die Lösung wird bei mäßiger Temperatur eingedampft. Hierbei wird event. anwesende Kieselsäure unlöslich. Der Rückstand wird dann mit molybdänsaurem Ammon behandelt. — Außerdem sind Arsenverbindungen, die bei dieser Methode ebenfalls in Reaktion treten, zu berücksichtigen. Mit Ammoniummolybdat wird organisch gebundene Phosphorsäure (Nukleoproteide, s. d.) ebenfalls Reaktionen geben, vornehmlich nach längerer Zeit oder bei gelindem Erwärmen; um diese jedoch mit Sicherheit nachweisen zu können, müssen die Präparate verascht werden. Die Asche liefert sofort einen Niederschlag, der die Gesamtphosphorsäure anzeigt. — Zur Ermittelung der Lokalisation kann die Reaktion oft nicht dienen, da das Ammoniumphosphormolybdat vorwiegend außerhalb der Zellen entsteht. Anderseits hat die Reaktion bei amylumreichen Schnitten den Vorteil, daß die Säure des Reagens die Stärke löst und die Fällungen besser sichtbar werden. Auch ist

zu beachten, daß bei Ermittelung von Phosphaten (S. 89) die gleichzeitig erfolgende Alkaloid- und Eiweißfällung störend wirken kann, vorzüglich bei Samen.

Sehr empfindlich ist ferner der Nachweis mit Magnesiummixtur von Pfeffer[1]). Diese Reaktion wird durch andere organische Substanzen nicht verhindert (Schimper)[2]). Man benutzt gesättigte wässerige Lösungen von Magnesiumsulfat und von Chlorammonium. Zum Gebrauch mischt man 25 Volumen Magnesiumsulfatlösung mit 2 Volumen Chlorammoniumlösung und 15 Volumen Wasser (Zimmermann). Es bilden sich recht charakteristische Kristalle von Ammonium - Magnesium - Phosphat. Die Kristalle gehören dem rhombischen System an und besitzen ein verschiedenes Aussehen. Man trifft sargdeckelartige Formen, kreuzförmig angeordnete Prismen, 4—8strahlige Sterne, deren Strahlen in kleine Täfelchen auslaufen, sowie X- und H-artige Kristallskelette (Fig. 24). Nebeneinander treten meist verschiedene Kristallformen auf[3]). Die Kristalle sind unlöslich in Ammoniak, lösen sich aber leicht und schnell in Säuren, selbst in Essigsäure. Trägt man die Schnitte direkt in die Magnesiamischung ein, so erhält man die Kristalle zum großen Teile innerhalb der Zellen. Neuere Erfahrungen zeigen, daß die zur Bildung von Ammonium-Magnesium-Phosphat nötige Menge Magnesium, wenn auch nicht immer, so doch oft, neben den Phosphaten in den Geweben enthalten sind. In derartigen Fällen genügt zur Kristallbildung schon ein Zusatz

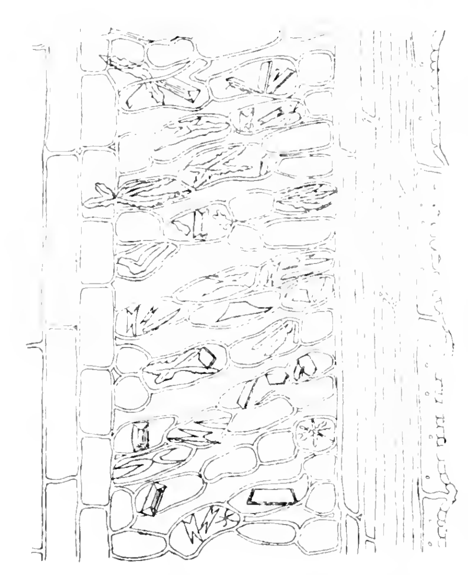


Fig. 24. Phosphornachweis mit Magnesiumgemisch, Equisetum arvense (Längsschnitt) (Tunmann).

[1]) W. Pfeffer, Untersuchungen über die Proteinkörner u. die Bedeutung des Asparagins beim Keimen d. Samen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1872, VIII, S. 429.

[2]) A. F. W. Schimper, Flora, 1890, LXXIII, S. 216.

[3]) Die bei der Reaktion entstehenden Kristalle stimmen in jeder Hinsicht mit dem Mineral Struvit überein, wie O. Richter zeigte (Ein Beitrag zur Kenntnis des Magnesium-Ammonium-Phosphates $Mg(NH_4)PO_4 \cdot 6\,H_2O$, Tschermaks Min. u. Petrogr. Mitt., 1901, XX, S. 89).

von Ammoniak (Fig. 23a). Da anwesendes Kalium die analoge Verbindung in gleicher Kristallform bilden kann, so bleibt es in solchen Fällen fraglich, ob die Kalium- oder Magnesiumverbindung des phosphorsauren Ammoniums vorliegt. Zum Nachweis von Eiweiß-Phosphorsäure müssen die Präparate vorher verascht werden. So veraschte Pfeffer die Globoide der Aleuronkörner und fügte der Asche ammoniakalische Chlorammoniumlösung zu, worauf sich aus dem amorphen Magnesiumphosphat der Asche langsam Kristalle von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia ausschieden.

Die beiden im Vorstehenden besprochenen Methoden sind derzeit die besten Reaktionen auf Phosphorverbindungen. Es ist zweckmäßig, beide Reaktionen auszuführen, da sie sich ergänzen. Bleibt mit dem Magnesiumgemisch eine Reaktion aus, tritt aber mit Ammoniummolybdat nach einiger Zeit oder bei gelindem Erwärmen ein (wenn auch geringer) Niederschlag auf, so deutet dies auf eine organische Phosphorverbindung hin, die durch die Salpetersäure des Reagens zersetzt wurde. Legumin und Casein (Nucleoalbumin) geben nach einigen Minuten selbst ohne Erwärmung den charakteristischen gelben Niederschlag von Ammoniumphosphormolybdat, nicht aber Lezithin- und Glyzerin-Phosphorsäure. Erhält man mit dem Magnesiumgemisch runde oder elliptische Körner, so ist nach Iwanoff[1]) ein Hinweis darauf gegeben, daß die organische Phosphorverbindung als Eiweißverbindung vorliegt. Casein und Vitellin geben nämlich ähnliche kugelige Niederschläge[2]); Glyzerinphosphorsäure gibt mit dem Magnesiumgemisch einen kleinkörnigen Niederschlag, Lezithin reagiert aber nicht, auch nicht echtes Globulin (Conglutin).

Lilienfeld und Monti[3]) haben Untersuchungen ausgeführt, die neben dem Phosphor in Phosphaten auch den in organischer Bindung nachweisen sollten. Die Untersuchungen wurden mit tierischen Geweben ausgeführt und beruhen darauf, daß beim Eintragen eines phosphorhaltigen Gewebes in eine Salpetersäurelösung von Ammoniummolybdat die Molybdänsäure in den phosphorhaltigen Zellen niedergeschlagen wird. Da der Niederschlag nicht gut sichtbar ist, so wird die Molybdänsäure durch geeignete Mittel reduziert. Ungeeignet zur Reduktion erwiesen sich Zinnchlorür, Alkaloide, Eisenchlorid; Gerbsäure ließ sich eher verwenden. Die besten Resultate gab Pyrogallol Freie

---

[1]) L. Iwanoff, Das Auftreten und Schwinden der Phosphorverbindungen in den Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1901, XXXVI, S. 355.

[2]) Moraczewski, Ztschr. f. phys. Chem., 1898, XXV, S. 252.

[3]) L. Lilienfeld und A. Monti, Über die mikrochemische Lokalisation des Phosphors in den Geweben, Ztschr. f. phys. Chem., 1892, XVII, S. 410.

Phosphorsäure soll sofort gefällt werden, die gebundene erst bei längerem Behandeln der Schnitte mit molybdänsaurem Ammoniak. Letztere läßt sich jedoch durch Barytwasser oder Natriumkarbonat sofort in Freiheit setzen. Die Präparate kommen somit auf $^1/_2$ bis mehrere Stunden in molybdänsaures Ammoniak, werden dann gründlich mit Wasser ausgewaschen und gelangen schließlich auf einige Minuten in eine 20%ige wässerige Pyrogallollösung. Durch die Pyrogallollösung nehmen die phosphorhaltigen Zellen und Zellbestandteile je nach ihrem Phosphorgehalt eine gelbe, braune bis schwarze Färbung an. Werden die Präparate in Alkohol entwässert, dann hält sich die Färbung einige Zeit in Kanadabalsam.

Trotzdem dieses Verfahren auf botanischem Gebiete einer scharfen Kritik begegnete, wurde es von Pollacci[1]) warm empfohlen, der zur Reduktion Zinnchlorür benutzt, welches nach den Erfahrungen von Lilienfeld und Monti sich nicht bewährte. Die Molybdänsäure-Zinnchlorür-Reaktion wird in folgender Weise ausgeführt. Die Präparate (von lebendem oder von in Alkohol eingelegtem Material) werden mit Hilfe einer mit Platinspitzen versehenen Pinzette (oder mit Platindraht, Glasstäbchen) in eine Lösung von molybdänsaurem Ammoniak gebracht, deren Temperatur 40° nicht übersteigen soll, dann wiederholt gründlich mit durch wenig Salpetersäure angesäuertem Wasser ausgewaschen und schließlich in eine 4%ige wässerige Lösung von Zinnchlorür übertragen. Je weniger Phosphor zugegen ist, um so konzentrierter muß die Zinnchlorürlösung gewählt werden. Phosphor zeigt sich durch eine dunkelblaue bis blaugrüne Färbung im Gewebe an (Bildung von Molybdänsesquioxyd). Die Präparate sind in Glyzerin, Wasser, Kanadabalsam und verdünnter Salpetersäure haltbar. Das Molybdänsäure-Reagens hat folgende Zusammensetzung[2]): a) Lösung von 15 g kristallinischem molybdänsaurem Ammonium in 100 ccm ammoniakalischem Wasser; b) 70 Teile Salpetersäure (spez. Gew. 1,18) und 30 Teile Wasser. Gleiche Teile von a) und b) werden gemischt, der beim Mischen entstehende Niederschlag löst sich beim Schütteln. Pollacci[3]) hat seine Reaktion wiederholt verteidigen müssen.

---

[1]) G. Pollacci, Über die Verteilung des Phosphors in den pflanzlichen Geweben, Malpighia 1894, VIII, Sep.

[2]) G. Pollacci, Über die Methoden zum mikrochemischen Nachweis des Phosphors in pflanzlichen Geweben, Atti dell' Ist. Bot. dell' Univ. di Pavia, 1900, 2 Ser. VI, S. 15 und 1904, X, S. 16.

[3]) G. Pollacci, Über die mikrochemische Prüfung auf Phosphor vermittels des Molybdänreagens und Zinnchlorürs in tanninhaltigen Zellen, Malpighia 1895, IX, S. 370. — Andere Resultate als Pollacci erhielten Arcangeli (Sulla ricerc. microch. del Fosforo nei tessuti vegetatli, Att. d. Soc. Toscana, Pisa, 1902, XVIII) und nach E. Zacharias (Progr. rei bot., 1909, III, S. 127) auch Bertolo.

Die Kritik setzte mit einer Arbeit von Raciborski[1]) ein. Unvollständiges Auswaschen des molybdänsauren Ammoniums soll die Reaktion verursachen; die Salpetersäure bilde außerdem Xanthoprotein und dieses gibt mit Zinnchlorür eine ähnliche Reaktion: in gerbstoffhaltigen Zellen sei die Reaktion ebenfalls unbrauchbar. Auch Fiori hat in Gerbstoffzellen Schwarzfärbung beobachtet. Diese soll jedoch nach Pollacci in Säuren, also auch in der stets etwas sauren Zinnchlorürlösung langsam verschwinden, worauf bei Gegenwart von Phosphor die Blaufärbung hervortritt. Heine[2]) hat aber gezeigt, daß das von ihm hergestellte Histon, dessen Asche keine Phosphorreaktion gab, stärker nach Lilienfeld und Monti reagierte als eine phosporreiche Nukleinsäure.

Géneau de Lamarlière[3]) verfolgt die Phosphate in den Zellmembranen durch Erwärmen der Präparate mit einer Lösung von Ammoniummolybdat in Salpetersäure. Die Reaktion (Gelbfärbung) ist verschieden von der durch die Salpetersäure des Reagens bewirkten Reaktion. Letztere tritt auch in der Kälte ein und verblaßt beim Erwärmen. Doch bleibt es dahingestellt, in wie weit sich Silikate an der Reaktion beteiligen, die in vielen Fällen mit der Verholzungsreaktion zusammenfällt. Die Molybdänreaktion tritt noch ein, wenn man die Phoroglucinreaktion durch Behandeln der Präparate mit Eau de Javelle unmöglich gemacht hat. Lamarlière bringt ferner die mit Molybdänsalpetersäure behandelten Präparate in schwache Zinnchlorürlösung und erzielt Blaufärbung der Zellwände. Hierbei bläuen sich nun auch Membranen, die mit Molybdänsalpetersäure allein keine Reaktion geben. Die vorliegende Beobachtung bedarf somit einer weiteren Prüfung; sie stützt nicht die Angaben über die Lokalisation des organisch gebundenen Phosphors.

In Cyanophyceen und in Hefezellen weist Macallum[4]) organische Phosphorverbindungen nach, indem er das durch Alkohol gehärtete Material erst in Wasser, dann bei 35° auf 1/4—48 Stunden in salpetersaures Molybdänammon bringt, mit verdünnter Salzsäure kurz aus-

---

[1]) M. Raciborski, Krititisches Referat über die Arbeit von Lilienfeld und A. Monti, Über die mikrochemische Lokalisation des Phosphors in den Geweben, Bot. Ztg., 1893, LI, 2. Abt., S. 245.

[2]) L. Heine, Ztschr. f. phys. Chem., 1896, XXII, S. 132.

[3]) L. Géneau de Lamarlière, Quelques observations sur le molybdate d'ammonium employé comme réactif des membranes cellulaires, Bull. soc. bot. de France, 1902, XLIX, S. 183.

[4]) A. B. Macallum, On the cytology of non-nucleated organisms, Transact. Canadian. Inst., 1899, VI, S. 439 und: On the detection and localization of Phosphor, Proc. Roy. Soc., 1898, LXIII, S. 474.

wäscht und schließlich in eine 1%ige Lösung von salzsaurem Phenylhydrazin überträgt. Phosphorhaltige Zellbestandteile sollen blaugrün werden.

Phosphate treten in den lebenden Zellen fast nur in gelöster Form auf. In den frischen Blättern von Robinia pseudacacia und von Soja hispida hatte Nobbe[1]) Kalziumphosphat angegeben, eine Angabe, die aber von Kohl[2]) widerlegt wurde. Nachprüfungen ergaben für die erste Pflanze nur die Anwesenheit von Kalkoxalat. Zimmermann[3]) gibt für die lebenden Zellen der Stengel und Blätter einer Cyperusart Kalziumphosphat-Ausscheidungen an. Es sind runde Gebilde, die einen aus oxalsaurem Kalk bestehenden Kern besitzen, um den das Kalkphosphat schalenartig angelagert ist. Sie sind von einer Hülle umgeben, die bei langsamer Lösung der Grundmasse zurückbleibt. Die Globoide enthalten stets Phosphat (Kalk-Magnesium) in fester Form (s. Aleuronkörner). Phosphate scheiden sich aber, weniger beim Trocknen der Pflanzen, weit mehr und besser beim Einlegen frischer Pflanzen in Alkohol nach einiger Zeit aus. Die Ausscheidungen in Glyzerin sind meist von etwas abweichender Form. Unter diesen Ausscheidungen, die die Gestalt von Sphäriten besitzen, prävaliert der phosphorsaure Kalk.

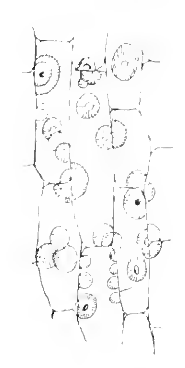


Fig. 25. Helianthus annuus (peripheres Markparenchym), in Alkohol zur Abscheidung gelangte, Kalziumphosphat enthaltende Sphärite (Tunmann).

Die sog. **Kalziumphosphatsphärite** (Fig. 25) lösen sich unter Deckglas nur langsam in Wasser, Ammoniak und in Essigsäure, leicht in Mineralsäuren, in Salzsäure ohne Gasentwicklung, in Schwefelsäure unter sofortiger Bildung von Gipsnadeln. Im polarisierten Lichte erscheinen sie wie Inulinsphärite oder Stärkekörner. In Glyzerin sind die durch Alkohol gefällten Sphärite unlöslich, sie halten sich daher in Glyzeringelatine. Diese Sphärite bestehen aber keineswegs nur aus phosphorsaurem Kalk. Schon Leitgeb[4]) wies darauf hin, daß sie keine chemisch einheitliche Substanz darstellen. Viele Sphärite, vornehmlich die

[1]) Nobbe, Hänlein, Councler, Vorläufige Notiz betr. das Vorkommen von phosphorsaurem Kalk in der lebenden Pflanzenzelle, Landw. Versuchsstat., 1879, XXIII, S. 471.

[2]) F. G. Kohl, Kalksalze, S. 156.

[3]) A. Zimmermann, Über Kalziumphosphatausscheidungen in lebenden Zellen, Beitr. z. Morph. u. Physiolog. d. Pflanzenzelle, 1893, H. III, S. 311.

[4]) H. Leitgeb, Über die durch Alkohol in Dahliaknollen hervorgerufenen Ausscheidungen, Bot. Ztg., 1887, XLV, S. 129 und: Über Sphärite, Mitt. d. bot. Inst. Graz, 1888, 1, 2. Heft, S. 257.

deutlich kristallinischen, besitzen einen amorphen Kern, der aus einer organischen Substanz noch unbekannter Natur besteht. Beim Glühen läßt sich an geeigneten Objekten (Dahlien, Asclepiadaceen, kaktusartige Euphorbiaceen, Mesembryanthemum-Arten) Verkohlung der Kernsubstanz beobachten. Der Kern löst sich nicht in Wasser, selbst nicht in heißem, ist auch unlöslich in Alkohol und in Äther. Er nimmt Farbstofflösungen (Boraxkarmin, Methylenblau) an, ohne die Farben zu halten. Denn beim Auswaschen verschwindet die Färbung wieder. Sphärite, die weder Schichtung noch Kern zeigen, lassen sich vollständig mit Karmin tingieren. Hier scheint die organische Substanz durch die ganze Masse der Sphärite verteilt zu sein. Nun vermögen größere Quantitäten von Kalziumphosphat Glykose zu lösen und so festzuhalten, daß sich selbst nach stundenlangem Einleiten von Kohlensäure der Kalk nicht ausscheidet. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß die Sphärite aus phosphorsaurem Kalk und einem Polysaccharid bestehen. Auch ist an das Vorkommen weiterer Doppelverbindungen der Phosphorsäure zu denken. Hansen[1]) meinte, daß die Kalziumphosphate in der lebenden Pflanze an Eiweißsubstanzen gebunden seien. So gibt Re[2]) in Agave americana Sphärite an, die aus Kalk, Phosphorsäure und einer noch unbekannten organischen Substanz bestehen. Letztere zeigt sich durch Bräunung der Sphärite bei Einwirkung von verdünnter Silbernitratlösung an. Die Sphärite der kaktusartigen Euphorbien (E. coerulescens, E. resinifera u. a.) sollen nach Belzung[3]) ein mit Äpfelsäure gepaartes Phosphat sein. Diese Sphärite sind zunächst amorph, nehmen erst später ihre radiäre Struktur an, lösen sich in Wasser und stimmen in ihrem Verhalten mit künstlichem apfelphosphorsaurem Kalk überein. — Bei den oben (S. 92) erwähnten Cyperus-Sphäriten löst sich der phosphorsaure Kalk selbst in heißem Wasser und $5\,^0/_0$iger Essigsäure nur sehr langsam. Eisessig übt keine Wirkung aus, erst bei nachfolgendem Wasserzusatz erfolgt Lösung. Durch Salzsäure wird der Kalziumoxalatkern gelöst, die Phosphathülle bleibt ungelöst zurück. In $10\,^0/_0$iger Kalilauge findet keine Veränderung statt. Ammoniak färbt die Sphärite gelb. Im polarisiertem Lichte erscheint die Grundsubstanz isotrop, der Kern stark aufleuchtend. Auch die Sphärite, die man in Helianthus annuus (Rinden- und Mark-

---

[1]) A. Hansen, Über die Bedeutung der durch Alkohol in Zellen bewirkten Kalziumphosphatausscheidungen, Flora, 1889, LXXII, S. 408.

[2]) L. Re, Über das Vorkommen von Sphäriten bei Agave americana, Annuar. Real. Istit. botan. di Roma, 1894, V, S. 38.

[3]) E. Belzung, Nature des sphérocristaux des Euphorbes cactiformes, Journ. de Bot., 1893, VII, S. 221.

parenchym) antrifft, müssen eine komplizierte Zusammensetzung haben. Sie lösen sich nicht in heißem Wasser und beim Kochen in Chloralhydrat. Die von Heinricher[1]) in Lathraea-Arten (Alkoholmaterial) studierten Phosphatkugeln zeigen keine Struktur und lösen sich nicht in Wasser, Chlorzinkjod, 3%iger Kalilauge und innerhalb vier Stunden in Eau de Javelle. In letzterem Reagens lösen sie sich nach 20 Stunden; in kochendem Wasser sind sie schwer und nicht völlig löslich. Hingegen sind sie schnell und leicht löslich in 1%iger Essigsäure, 1%iger Chromsäure, Pikrinsäure, verdünnten Mineralsäuren. In konz. Essigsäure lösen sich die Phosphatkugeln nur schwer. Ein Gehalt an Magnesium oder Kalzium ließ sich in ihnen nicht nachweisen. Ein eigenartiges, an die Sphärite von Euphorbium erinnerndes Verhalten zeigen nach Tunmann[2]) die durch Alkohol bewirkten Fällungen in Equisetum arvense. Lebende Schnitte, auf dem Objektträger mit Alkohol behandelt, zeigen in den Assimilationszellen kleine Sphärokristalle; in Alkoholmaterial sind die Ausscheidungen auf Gruppen von Zellen beschränkt. Sie sind schwer löslich in warmem Wasser und Chloralhydrat. Erst bei längerem Erwärmen lösen sich größere Anteile und zurück bleibt eine ölige Masse: Essigsäure und verdünnte Schwefelsäure lösen sehr schwer, konz. Schwefelsäure läßt braune Tropfen austreten unter Bildung von Gipsnadeln. Ammoniummolybdat und Magnesiumgemisch geben positive Resultate. Die Kristalle bestehen aus Phosphorsäure, gebunden an Kalzium und an einen noch unbekannten Körper, wahrscheinlich organischer Natur. Rodier[3]) beschreibt Sphärite im Alkoholmaterial von Senecio vulgaris und cineraria (Rinden- und Markparenchym). Sie gleichen den von Hansen in Euphorbia caput medusae angegebenen, haben eine radiär kristallinische Rinde und eine amorphe Zentralmasse. Letztere und die Hüllhaut sollen organischer Natur sein. Phosphor ist im Gewebe nur in geringer Menge nachweisbar. Die Kristalle sind löslich in kaltem Wasser, Essigsäure, Salzsäure, Salpetersäure ohne Gasentwicklung und geben mit verd. Schwefelsäure Gipsnadeln. Die Natur dieser Sphärite scheint doch noch fraglich zu sein. Ungemein reich an Kalziumphosphat fand Vogl[4]) die unterirdischen Teile von Dentaria enneaphylla L. (Cruciferen, Radix Saniculi), in denen sich in

[1]) E. Heinricher, Anatomischer Bau und Leistung der Saugorgane der Schuppenwurz-Arten, Cohns Beitr. z. Biol. d. Pfl., 1895, VII, Sep.

[2]) O. Tunmann, Bemerkungen über einige Kryptogamen-Drogen, Schweiz. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1910, XLVIII, Nr. 43.

[3]) E. Rodier, Sur la formation et la nature des sphérocristaux, Compt. rend., 1889, CVIII, S. 906.

[4]) A. v. Vogl, Üb. Rad. Saniculi d. Apoth., Öst. Apoth.-Ztg., 1904, XLVIII, Nr. 21.

der primären Rinde Sphärite bis zu 300 μ Durchmesser ausscheiden. Die großen Sphärite sind nun häufig mit einer dicken amorphen oder fein radial gestreiften Schale umgeben, die, „wenn nicht allein, so doch hauptsächlich Eiweißstoffe“ enthält, während nur der kristallinische Kern aus Kalziumphosphat besteht. Die Kristalle in Holz und Rinde des Teakholzes (Tectona grandis L.) wurden von Wiesner[1]) für Kalziumphosphat gehalten. Die Asche des Holzes enthält 29 % Phosphorsäure (Thoms)[2]). Nach Kohl[3]) bestehen die Kristalle aus Kalkoxalat, da sie sich in verdünnter und in konzentrierter Essigsäure nicht lösen.

Cobaltnitrat (1 : 100) kann als Hilfsreaktion beim Nachweis von Kalziumphosphat dienen. Kalziumphosphatzellen (zuweilen auch die Inhalte der Siebröhren) geben mit verd. wässeriger Cobaltnitratlösung beim Aufkochen einen blauen Niederschlag. Doch muß die Gegenwart der Phosphate mit weiteren Reagentien festgestellt und die beim Einlegen in Alkohol entstehende Ausscheidung studiert werden.

Weit seltener sind bisher Ausscheidungen von **phosphorsaurer Magnesia** gefunden worden. Drusen und Sphärokristalle von Magnesiumphosphat traf Hansen[4]) in frisch in Alkohol eingelegten Stengelstücken von Saccharum officinarum an. Die Kristalle lösen sich schwer in kaltem Wasser und in Essigsäure, besser in heißem Wasser, leicht in Salzsäure (ohne Gasentwicklung), Salpetersäure und Schwefelsäure (ohne Bildung von Gipskristallen). Magnesium wurde mit ammoniakalischer Lösung von Chlorammon und Natriumphosphat, Phosphorsäure mit molybdänsaurem Ammon nachgewiesen. Ähnliche Bildungen hat Zacharias[5]) in den Siebröhren von Cucurbita pepo angetroffen.

Arsen (arsenige Säure).

Arsenige Säure und ihre Salze sind selbst in kleinsten Dosen für die Wurzeln höherer Pflanzen starke Gifte. Relativ unschädlich ist noch arsensaures Kali. Wahrscheinlich existieren noch weitere relativ unschädliche Arsenverbindungen, die von den Pflanzen, wenigstens in minimen Mengen, ohne Schädigung aufgenommen werden. Arsenverbindungen stehen den Pflanzen zur Verfügung in vielen Gesteinsarten (im Mergelboden Colorados), im Meerwasser (Gautier) und in Düngemitteln (Superphosphate enthalten 0,3 % Arsen, Stoklasa). Auch aus Desinfek-

---

[1]) J. Wiesner, Über die Ablagerung von kohlensaurem Kalk im Stamme dikotyler Holzgewächse, Sitzber. Wiener Akadem., 1881, II, S. 7.

[2]) G. Thoms, Landwirtsch. Versuchsstat., 1879, XXIII, S. 413.

[3]) F. G. Kohl, Kalksalze, S. 156.

[4]) A. Hansen, l. c., S. 115.

[5]) E. Zacharias, Bot. Ztg., 1884, XLII, S. 65.

tionsmitteln wird Arsen aufgenommen. In den Weinkulturen benutzt man zum Bespritzen Bleiarseniat. Erfolgt die Behandlung vor dem Blühen der Reben, dann sind die reifen Trauben arsenfrei; wird nach dem Blühen mit Arsen bespritzt, dann konnten L. Moreau und Vinet (1911) in 100 g Trauben 0,4 mg Arsen nachweisen. Plato und Guth zogen Penicillium brevicaule auf arsenhaltigem Agar (1 : 50000). Der Pilz entwickelte dabei den für Arsenverbindungen typischen Knoblauchgeruch. Nachdem Gautier (1910) Arsen als normalen Bestandteil in Meeresalgen gefunden hat, haben Tassily und Leroide (1910) folgende Quantitäten ermittelt: Chondrus crispus 0,070 mg, Fucus vesiculosus 0,010 mg, Mousse de Corse 0,025 mg, Laminaria digitata 0,010 mg, das Präparat Gelose 0,020 bis 0,025 mg Arsen in je 100 g.

Der Nachweis im Gewebe und mit Schnitten ist noch nicht versucht worden. Mit Arsenverbindungen bespritzte Pflanzen (s. ob.) müßten als Versuchsobjekte dienen. Zum makroskopischen Arsennachweis zerstörten Gautier und Bertrand[1]) 100 g Substanz zunächst mit 4 g Schwefelsäure und 40 g Salpetersäure, dann bis zur vollständigen Verkohlung der Masse mit Salpetersäure in der Hitze. Die fein zerriebene Kohle wird mit Wasser ausgezogen, das Wasserextrakt mit Schwefelwasserstoff behandelt und der Niederschlag im Marshschen Apparat untersucht. Die Sublimation wurde bereits von Helwig[2]) zum mikrochemischen Nachweis benutzt, der Abbildungen und Beschreibungen der Sublimationskristalle gibt. Später benutzten Hartwich und Toggenburg[3]) die Sublimation der arsenigen Säure und verbinden sie mit der Kapillaranalyse. Dieses Verfahren dürfte sich jedenfalls auch für Pflanzen eignen. Aus arsenhaltigen Suppen wurde kapillaranalytisch Arsen im Filtrierpapierstreifen aufgesaugt, die arsenhaltige Zone aus dem Streifen herausgeschnitten, mit Wasser ausgekocht und der wässerige Auszug eingedampft. Der mit Sand gemischte Rückstand kommt auf ein Uhrgläschen innerhalb eines aufgesetzten 1 cm hohen Glasrohres. Das Glasrohr wird oben mit einer kleinen Glasplatte geschlossen. Die Sublimation erfolgt bei kleinster Flamme. Bei Verwendung reiner Substanz lassen sich noch aus 0,01 mg Arsenigsäureanhydrid Sublimate erhalten. Das Sublimat enthält reguläre Oktaeder und Tetraeder, seltener monokline Prismen und kann in heißem Wasser gelöst und daraus mit 0,1 % Silbernitrat und stark verdünntem Ammoniak in feine gelbe Nädelchen von Silberarsenit übergeführt werden. — Haushofer[4]) empfiehlt zum Nachweis von Arsensäure die schwach

[1]) A. Gautier, Compt. rend., 1900, CXXIX, S. 936; G. Bertrand, Ann. Inst. Pasteur, 1902, XVI, S. 553.

[2]) A. Helwig, Das Mikroskop in der Toxikologie, Mainz 1865.

[3]) C. Hartwich und F. Toggenburg, Nachweis von arseniger Säure durch Mikrosublimation, Schweiz. Wchschr. f. Chem. u. Pharm., 1909, XLVII, Nr. 52.

[4]) K. Haushofer, Mikr. Reakt., S. 15.

alkalische Lösung mit Magnesiumsulfat und Chlorammonium zu versetzen. Die Niederschläge gleichen den Kristallen von Magnesiumammoniumphosphat. In neuerer Zeit benutzt man hierzu ein Körnchen Magnesiumazetat.

Bor.

Bor ist in Spuren in Pflanzen, die auf borathaltigem Boden wachsen (Kalifornien, Italien) vielfach gefunden worden, besonders im Obst, Vitis (Kalifornien), dann in Hedera helix, Humulus lupulus u. a. In nicht zu geringen Mengen wirkt es fördernd auf das Wachstum (katalytische Düngemittel Bertrands). Große Mengen wirken giftig.

Der Nachweis im Gewebe ist noch nicht versucht worden. Da geeignetes Material nicht überall zur Verfügung steht, wird man sich die Versuchspflanzen bei borathaltiger Düngung kultivieren müssen. Der Nachweis wird bei nicht zu geringen Mengen mittels der Kurkumareaktion gelingen, wenigstens geht dieses aus dem Kurkuminnachweis (s. d.) hervor. Die Schnitte müßten in Kurkumatinktur eingetragen werden, dann wird die Flüssigkeit verjagt. In den trockenen Präparaten werden die borsäurehaltigen Zellen eine rotbraune Färbung annehmen, die Färbung wird bei Zusatz von Natronlauge vorübergehend blau werden.

Bei Auszügen wird man in gleicher Weise verfahren oder die Empfindlichkeit durch Anwendung von Kurkumaleinenfaser steigern (Empfindlichkeitsgrenze 0,0005 µg, Emich)[1]. Die filtrierte Abkochung von 5 g Kurkumapulver in 10 g Weingeist wird zur Trockne gebracht und der Rückstand in einigen Kubikzentimetern 50 % Weingeist unter Zusatz von wenig Soda gelöst. Mit der Lösung wird gebleichte Leinenfaser (oder Baumwolle, nicht Schafwolle oder Seide) aufgekocht. Nach der Färbung wird die Faser herausgenommen, abgepreßt, in stark verdünnter Schwefelsäure abgespült, in Wasser ausgewaschen und getrocknet vorrätig gehalten. Den mit Salzsäure angesäuerten Probetropfen läßt man nun auf dem Objektträger an einem Ende der Kurkumafaser eintrocknen; hat sich das Ende braun gefärbt, dann bewirkt Zusatz von 13 % Sodalösung vorübergehend Blaufärbung.

Kohlenstoff.

Kohle.

Zum Nachweis der Kohle bedient man sich des von Wiesner[2]) erprobten Chromsäure-Gemisches, welches, wie Zimmermann[3])

[1]) J. Donau, Lieb. Ann., 1907, CCCLI, S. 426.

[2]) J. Wiesner, Über den mikroskopischen Nachweis der Kohle in ihren verschiedenen Formen und über die Übereinstimmung der Lungenpigmente mit der Rußkohle, Sitzber. Wien. Akad., 1892, CI, 1. Abt., S. 379.

[3]) A. Zimmermann, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1892, IX, S. 264.

mitteilt, von Crüger in die botanische Mikrotechnik eingeführt wurde. Eine konzentrierte wässerige Lösung von Kaliumdichromat wird mit überschüssiger Schwefelsäure versetzt; dann wird soviel Wasser zugefügt, als erforderlich ist, um die sich ausscheidende Chromsäure in Lösung zu halten. Das Reagens gestattet eine Ermittlung des Grades der Verkohlung. Amorpher Kohlenstoff ist, selbst in seinen kleinsten Teilchen, völlig undurchsichtig und wird erst, ebenso wie Ruß, nach längerer Zeit von dem Chromsäuregemisch angegriffen und gelöst. Hingegen wird Braunkohle, die in kleinsten Teilchen braun gefärbt und durchscheinend erscheint, nach kurzer Zeit bis auf einen farblosen Rückstand gelöst. Dieser Rückstand läßt zuweilen die Zellstruktur deutlich erkennen und gibt Zellulosereaktion. Anthrazit besteht aus braungefärbten, durchscheinenden Körnchen, die sich im Chromsäuregemisch ohne Zelluloserückstand lösen, und aus schwarzen Teilchen, die mit der Braunkohle übereinstimmen. In der Steinkohle finden sich amorpher Kohlenstoff, Braunkohlepartikelchen und verkohlte Harze. Die Holzkohle läßt sich unterscheiden als Rotkohle (mit der Braunkohle übereinstimmend) und als Schwarzkohle (wie Rußkohle sich nur sehr schwer im Chromsäuregemisch lösend, aber noch Zellstrukturen zeigend). Graphit enthält kleine schwarze Körnchen, die selbst nach 2 Monaten im Chromsäuregemisch unverändert bleiben. — Auch starke Bleichmittel werden sich zur Diagnose eignen. Lignit wird durch Kaliumchlorat-Salzsäure bis zur blaßgelben Farbe aufgehellt (T. F. Hanausek, Kohleschicht, Sitzber. Wien. Akad., 1907, CXVI, S. 11), Kohle aber nicht (Ed. Praël, Schutz- u. Kernholz, Diss. Rostock, 1888, S. 71).

Kohlensäure und Karbonate.

Unter den Karbonatausscheidungen steht weitaus der kohlensaure Kalk an erster Stelle[1]). Nur in geringerer Menge finden sich andere kohlensaure Alkalisalze. Die Kalküberzüge der Potamogetonarten führen relativ große Anteile an kohlensaurer Magnesia. Die Trichome der Bohnen und Malvaceen scheiden kohlensaures Kali aus. Die meisten Hydathoden (Haberlandt) scheiden kohlensauren Kalk an die Oberfläche aus. Bei den Gesneraceen ist der subkutikulare Raum der Drüsen mit kohlensaurem Kalk erfüllt, ohne daß es zu einer Ausscheidung nach außen kommt (Solereder). Das ausgeschiedene Karbonat bildet kleine Schüppchen, überzieht auch zuweilen krustenartig die ganze Oberfläche (Wüstenpflanzen). An vielen submersen Pflanzen zeigt die Oberfläche einen Karbonatüberzug, der aber überwiegend aus dem Wasser stammt. Es sei ferner an die Kalkalgen erinnert, bei denen der Kalk nicht nur der Membran aufgelagert, sondern ihr auch eingelagert ist. Kalkeinlagerungen der Membran kommen vor-

[1]) Vergl. auch: Kohl, Kalksalze u. Kieselsäure, S. 98; Haberlandt, Physiolog. Pflanzenanatomie, S. 430; Solereder, Systemat. Anatomie, S. 934 u. a.

zugsweise bei Trichomen vor und werden oft von Kieselsäure begleitet (Cruciferen, Saxifragaceen, Boragineen, Compositen, Loaseen, Umbelliferen, Urticaceen u. a.). Mehr oder weniger umgebildete Trichome, die Karbonate führen, sind auch die Cystolithen (gestielt) und die cystolithenähnlichen Gebilde (ungestielt), die im Innern der Gewebe (hauptsächlich in Epidermiszellen, nicht im Holze) und in Trichomzellen (Haarcystolithen) auftreten (Urticaceen, Acanthaceen, Cucurbitaceen u. a.).

Zum Teil sind die Ausscheidungen amorph, bei Hanburia mexicana finden sich rhomboedrische Kristalle von Kalziumkarbonat abgelagert in den gemeinsamen Wänden einzelner Zellgruppen der Epidermis. Kristalle finden sich ferner zwischen den Rindenzellen einzelner Charen, auf den Hyphen von Pilzen, in den Blatthöhlen von Lathraea squamaria. Auch das Karbonat der Cystolithen ist doppelt lichtbrechend, also kristallinischer Natur. Im Zellinhalte ist kohlensaurer Kalk angetroffen worden in Form kleiner Körnchen bei Myxomyceten und bei Mucorineen, in Cotyledonen von Urtica dioica, in Perikarpien von Lithospermum, Celtis, Cerinthe, sowie im Kernholz (Gefäße, Tracheiden, Thyllen) einiger Dikotylen (Ulmus, Sorbus, Pirus, Fagus, Salix, Betula u. a.). Betreffs des Vorkommens im Kernholz möchte ich daran erinnern, daß Glykose große Mengen Kalziumkarbonat in Lösung zu halten vermag. Beim Übergang der Elemente ins Kernholz wird der Gehalt an Glykose abnehmen, so daß es zur Karbonatausscheidung kommt. — In physiologischer Hinsicht sollen die Inkrustationen einen Schutz gegen Tierfraß bedingen (Stahl), bei den Kalkalgen nach Kohl, der die Cystolithen als Kalkspeicher anspricht, mechanisch und festigend wirken. Auch die Kalkfüllungen des Kernholzes dürften festigend wirken. Durch Kalkausscheidungen, die Kohl mit der Atmung in Zusammenhang bringt, wird ein Transpirationsschutz erzielt (Volkens).

Zum Nachweis der Kohlensäure in den Ausscheidungen von Kalziumkarbonat benutzt man vorteilhaft nur konzentrierte Salzsäure. (Die hier und da empfohlene Essigsäure löst, verdünnt angewandt, zu langsam.) Man lege das Präparat in einen kleinen Tropfen Wasser, so daß nur das Präparat selbst vom Wasser bedeckt ist, und füge während der Beobachtung konzentrierte Salzsäure zu, deren Einwirkung durch seitliches Heben des Deckglases beschleunigt wird. Derart lassen sich selbst geringe Quantitäten Kohlensäure an der „Blasenbildung" nachweisen. Liegt das Präparat in viel Wasser und erfolgt die Lösung infolge Anwendung einer schwachen Salzsäure oder einer konzentrierten Essigsäure langsam, so kommt es vor, daß die allmählich frei werdende Kohlensäure von der Untersuchungsflüssigkeit absorbiert wird und sich der Sichtbarmachung entzieht (Melnikoff)[1]. — Durch Glühen wird das Kalziumkarbonat in Kalziumoxyd übergeführt, verliert also die Kohlensäure; die Präparate geben mit Salzsäure keine Blasenbildung mehr. (Über Cystolithen s. Kalzium.)

---

[1]) P. Melnikoff, Untersuchungen über das Vorkommen des kohlensauren Kalkes in Pflanzen, Dissertation Bonn, 1877.

Schwefelkohlenstoff.

Über Schwefelkohlenstoff liegen nur wenige Erfahrungen vor. Jedenfalls ist er in Gasform ein giftiger Körper, und Bokorny zeigte, daß Holzpflanzen durch einen Gehalt des Bodens an Schwefelkohlenstoff geschädigt werden. Bekannt ist ferner, daß im Senföle kleinere Mengen Schwefelkohlenstoff (A. W. Hofmann) vorkommen. Diese bilden sich bei der Einwirkung von Myrosin auf das Glykosid Sinigrin (Gadamer), weil letzteres ein Molekül Wasser enthält, und Wasser Allylisothiocyanat sehr leicht angreift.

Schwefelkohlenstoffausscheidungen in Gestalt stark lichtbrechender Tröpfchen fand Went[1]) an den Seitenzweigen des Mycels von Schizophyllum lobatum Bref., einem Pilze, der auf Java allgemein verbreitet ist auf toten Zweigen (Bambusen, Zuckerrohr) und einen intensiven Geruch entwickelt. Der Pilz wurde auf Zuckerpeptonagar gezüchtet, die Kulturflüssigkeit destilliert, das Destillat in alkoholische Kalilauge aufgefangen und makrochemisch der Schwefelkohlenstoffgehalt ermittelt durch Neutralisation mit Essigsäure und Zusatz von Kupfersulfatlösung (gelber Niederschlag von xanthogensaurem Kupfer). Eine mikrochemische Bearbeitung der Ausscheidungen fehlt noch. Der Schwefelkohlenstoff wird wahrscheinlich von kleinen Drüsen (Knötchen) ausgeschieden.

Silicium.

Kieselsäure kommt vorzugsweise in den Zellwänden vor. Ob sie nur die Membranen inkrustiert oder mit der Membransubstanz verestert ist, bleibt noch unsicher. Verkieselte Membranen zeichnen sich durch Härte und Festigkeit aus, gewähren den Pflanzen einen Schutz[2]) und sind nach v. Mohl[3]) noch wachstumsfähig; daher nimmt die Kieselsäure während der Entwicklung dauernd zu. Schon Sachs zeigte (an Wasserkulturen von Zea u. a.), daß sie zum Leben nicht unbedingt nötig ist. Oft tritt sie gemeinsam mit Kalziumsalzen auf, oft vertritt sie diese. Bekannt sind die Kieselpanzer der Diatomeen (Kieselgur): viele Pilze (Secale cornutum), Gefäßkryptogamen (Equisetum-Arten, reichlich 4 %) und Monokotylen (Gramineen, die Asche von Saccharum officinarum besteht fast nur aus Kieselsäure, Cyperaceen, Palmen) führen Membrankieselsäure, ebenso zahlreiche Familien der Dikotylen[4]) (Urticaceen, Aristolochiaceen, Euphorbiaceen, Compositen, Cucurbitaceen, Chrysobalaneen, Burseraceen u. a.). — In der Asche von Holz und Rinde sind überwiegend nur wenige Prozent Kieselsäure, in der Cautorinde aber 98 %, im Holz der Coniferen meist 10, der Cedrela-Arten oft 30—50 %. — Reich an Kieselsäure sind die kutikularisierten Membranen der Epidermen und

[1]) F. A. Went, Schwefelkohlenstoffbildung durch Schizophyllum lobatum, Ber. deutsch. bot. Ges., 1896, XIV, S. 158.

[2]) E. Stahl, Pflanzen und Schnecken, Jena 1888, S. 72.

[3]) H. v. Mohl, Über das Kieselskelett lebender Pflanzenzellen, Bot. Ztg., 1862, XX, S. 230.

[4]) Vollständiges Verzeichnis der Dikotylen bei H. Solereder, Syst. Anat. d. Dikotyled., Ergzbd., 1908, S. 353.

Trichome (Kutikularwärzchen, Haarknoten); teils ist die gesamte Außenmembran verkieselt, teils nur bei bestimmten Zellgruppen (Grenzzellen der Trichome). Stark verkieselt sind verbildete Spalten, auch der Ausführungskanal des Entleerungsapparates der Myrtaceen[1]). Seltener sind Korkzellen verkieselt (Liquidambar, Croton eluteria)[2]).

Bei der Diagnose sind die Kieselmembranen bisher viel zu wenig beachtet worden; sie leisten in sehr vielen Fällen vorzügliche Dienste, so sind die Trichome der Digitalisverfälschungen (Inula-Arten, Symphytum officinale) verkieselt, Digitalistrichome nicht verkieselt[3]). Mit Hilfe kieselhaltiger Aschenskelette konnte Cyperus esculentus im Darminhalte 6000 Jahre alter ägyptischer Mumien nachgewiesen werden[4]).

Weit weniger oft finden sich Kieselsäureausscheidungen im Zellinnern. Diese können entweder frei im Zelllumen liegen oder sind, der häufigere Fall, der Zellwand an einer Stelle angeheftet (Cyperus alternifolius). Kohl hält diese „Kieselkörper“ als Konkremente von fast reiner Kieselsäure, da sie keine Zellulosereaktion geben, und führt die Bräunung beim Glühen auf anhaftende Substanzen zurück. Doch finden sich zuweilen bei den Aristolochiaceen große Kieselkörper, deren zentrale, ungeschichtete Masse nicht verkieselt ist, aber auch keine Zellulosenreaktion gibt[5]). Zudem ist es nicht ausgeschlossen, daß die Kieselsäure als organische Verbindung (ähnlich wie der Kohlenstoff) auftritt, wodurch sich die Bräunung beim Glühen erklären würde. Es ist auch möglich, daß Zellulose übersehen wurde (s. S. 105). Nach Kohl soll bei Kieselkörpern zuerst das Plasma verkieseln. Ausfüllung von Gefäßen und anderen Elementen des Kernholzes ist zuerst wohl von Crüger[6]) bei der Stammpflanze der Cautorinde, der westindischen Chrysobalanee Moquilea, beobachtet worden, kommt auch bei einigen Verbenaceen vor. Im Rindenparenchym von Moquilea greift der geschichtete, doppelbrechende, opalisierende Kieselkörper selbst in die feinsten Tüpfelkanäle und in die Interzellularen hinein. Mohl (l. c.) fand ähnliche Bildungen nahe den Gefäßen in den Blättern von Magnolia glauca, Licania crassifolia, Davilla brasiliana, Hirtella racemosa Lam., Mirbelia nilagirica Zenk.

Kieselkörper finden sich ferner im Holzparenchym und in den Markstrahlen von Petrea volubilis; bei Petrea arborea sind auch Gefäße und Thyllen verkieselt (Crüger, l. c.). Sie kommen vor in den Blättern von Chrysobalanus icaco, Hirtella punctata Miq., Davilla radula Mart. (Mohl, l. c.), in Hymenophyllaceen (Mettenius[7])), in Palmen und Moraceen (Phoenix dactylifera, Caryota urens,

---

[1]) O. Tunmann, Entleerungsapparat der Myrtaceendrüsen, Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 25.

[2]) Hockauf, Pharm. Post, 1897, XXX, Nr. 51.

[3]) C. Hartwich u. Bohny, Apoth.-Ztg., 1906, XXI, S. 277.

[4]) Fr. Netolitzky, Arch. f. Chem. u. Mikr., 1911, IV, Heft 5.

[5]) Tunmann, Micania Guaco (Rhizoma Aristolochiae), Gehe's Ber., 1910.

[6]) Crüger, Westind. Fragmente, Bot. Ztg., 1857, XV, S. 299.

[7]) Mettenius, Abhandl. d. Kgl. sächs. Ges. d. Wissensch., 1864, VII 2, S. 419.

Rosanoff[1]), Treub[2])), in den Blättern der Podostemaceen (Epidermis, subepidermale Zellen, Trichome, Cario[3]) und in den langgestreckten Zellen nahe der Gefäße, Warming[4])). Außerdem untersuchten Kieselkörper Licopoli[5]) bei Chamaerops humilis L. und anderen Palmen, Pfitzer[6]) bei Orchideen, Kohl bei Palmen, Orchideen, Scitamineen, Grob[7]) bei Gramineen, Solereder[8]) bei Aristolochiaceen, wo sie ein wichtiges diagnostisches Merkmal bilden. Schließlich sei noch der Kieselkörper im Holzparenchym der Dipterocarpeen, Malvaceen, Sterculiaceen, Tiliaceen, Burseraceen, Anacardiaceen, Sapotaceen gedacht, die von Bargagli-Petrucci[9]) beschrieben wurden. Kieselkörper sollen auch im Milchsafte von Antiaris toxicaria vorkommen (Gorodetzky[10])). Wenn auch die Kieselkörper überwiegend in Blättern auftreten, so finden sie sich doch bisweilen in Früchten und in Samen. Crüger fand Kieselkörper in der Frucht von Scleria flagellum. Schad[11]) beschreibt feinwarzige Körner in den Sklereiden der Samen von Elettaria cardamomum, Bochmann[12]) und Stscherbatscheff[13]) dergleichen in den Palisaden der Malvaceensamen, die vorher Lohde[14]) als Wandverdickungen angesprochen hatte. Anderseits sollen die zuerst von Beck beschriebenen Kieselsäure-Körperchen der Papilionaceen-Samen nach Mattirolo und Buscalioni[15]) Reste von Zellkernen sein. Wahrscheinlich werden sich, in vielen Fällen wenigstens, Kieselkörper dort im Samen finden, wo sie in den vegetativen Teilen der betreffenden Pflanzen auftreten.

Um Hinweise auf Kieselsäure zu erhalten, kann man Vorprüfungen anstellen. Bringt man nämlich, wie Küster fand, Präparate mit Kieselkörper oder mit verkieselten Membranen in einen Tropfen Benzol,

---

1) Rosanoff, Über Kieselsäureablagerung in einigen Pflanzen, Bot. Ztg., 1871, XXIX, S. 749.

2) M. Treub, Observations sur le Sclérenchym, Amsterdam 1877.

3) Cario, Anatom. Unters. von Tristicha hypnoides Spreng., Bot. Ztg., 1881, XXXIX, S. 28.

4) E. Warming, Kiselsyre dannelser hos Podostemaceae, Kjobenhavn 1881.

5) Licopoli, Ricerch. e microchim. s. Chamaerops humilis L., Att. d. R. Ac. d. Science fis. e mat. di Napoli, 1881, XI.

6) R. Pfitzer, Flora, 1877, LX, S. 245.

7) Grob, Beitr. z. Anat. d. Epiderm. d. Gramineenblatt., Zürcher Dissertat. 1896.

8) H. Solereder, Vergl. Anatom. d. Aristolochiaceen, Englers Jahrb., 1889, X, S. 410.

9) Bargagli-Petrucci, Malpighia, 1902.

10) Serg. Gorodetzky, Antiaris toxicaria in pharmakogn. u. pharmakodynamischer Hinsicht, Pharm. Ztschr. f. Rußland, 1895, S. 248.

11) A. Schad, Unters. über d. Malabar-Kardamomen, Berner Dissertat. 1897.

12) F. Bochmann, Samen und Früchte, Berner Dissertat. 1901.

13) D. Stscherbatscheff, Entw. einig. off. Pfl., Arch. d. Pharm., 1907, CCXLV, S. 48.

14) Lohde, Über den Bau einiger Samenschalen, Dissertat. Leipzig 1874.

15) O. Mattirolo u. L. Buscalioni, Ricerche anatomico-fisiologiche sui tegumenti seminali delle Papilionacee, Accad. di Torino, 1892, XLII_2.

Nelkenöl oder Phenol, so nehmen verkieselte Bestandteile einen rötlichen Glanz an[1]. Am besten eignet sich hierzu reines Phenol, verharztes Nelkenöl und Monobromnaphthalin, Das Präparat gelangt trocken auf den Objektträger und wird mit einer kleinen Messerspitze kristallisierten Phenols bedeckt: das Phenol wird durch gelindes Erwärmen geschmolzen, dann abgesaugt und durch Nelkenöl ersetzt. Erforderlichenfalls kann in Kanadabalsam eingeschlossen werden. Selbst schwach verkieselte zarte Membranen lassen sich auf diese Weise herausfinden. Der rote Glanz wird wahrscheinlich durch den Brechungsunterschied von Objekt und Untersuchungsmedium bedingt. Küster fand ferner, daß die Kieselkörper der Chrysobalaneen Methylenblau und Gentianaviolett speichern. Die gleiche Eigentümlichkeit zeigt übrigens Tabaschir; dieser Körper wird außerdem durch Jodchloroform und Jodschwefelkohlenstoff braun (Ambronn)[2], ein Verhalten, welches die Kieselkörper der Chrysobalaneen nicht zeigen. Hingegen nehmen die Kieselfüllungen nach dem Glühen in violetter Jodlösung ebenfalls wie Tabaschir eine braune Färbung an. Das gleiche gilt von den verkieselten Membranen der Chrysobalanaceen und auch nach Wieler[3]) von den Kieselausfüllungen der Interzellularen des interfaszikularen Grundgewebes von Saccharum.

Der gebräuchlichste Nachweis der Kieselsäure in Membranen oder in Zellinhalten geschieht durch Veraschung. Ist die Kieselsäure in den Membranen in größerer Menge abgelagert, dann bleiben die Präparate nach dem Glühen im Zusammenhang als sog. Kieselskelette. Die Präparate werden am besten auf einem Glimmerplättchen über einer Spiritusflamme geglüht. Nach dem Abkühlen wird das Plättchen auf einen Objektträger gelegt, dann wird etwas Wasser zugefügt: nach dem Auflegen eines Deckglases wird das Präparat mikroskopisch durchmustert. Es hält nun schwer, durch Glühen allein rein weiße Rückstände zu erzielen. Gewöhnlich sind gleichzeitig mehr oder weniger große braune oder schwarze Anteile von verkohlten Produkten zugegen. Es ist daher bei allen Objekten ratsam, den Glühprozeß durch die Wirkung von Säuren zu unterstützen. Die Präparate werden auf dem Glimmerplättchen in konzentrierter Salzsäure erhitzt, dann wird geglüht, der Asche nochmals ein Tropfen Salzsäure zugefügt und vorsichtig weiß ge-

---

[1]) E. Küster, Über Kieselablagerungen im Pflanzenkörper, Ber. deutsch. bot. Ges., 1897, XV, S. 136 und: Die anatomischen Charaktere der Chrysobalaneen, Bot. Zentralbl., 1897, LXIX, S. 46.

[2]) H. Ambronn, Mitt. an Küster, Ber. deutsch. bot. Ges., 1897, XV, S. 137.

[3]) A. Wieler, Beiträge zur Anatomie des Stockes von Saccharum, Fünfstücks Jahrb., 1897, II, 1.

brannt. Die Veraschung mit Salzsäure ist bei kieselsäurearmen Objekten, wie bereits Zimmermann[1]) angibt, dem Verfahren von Sachs vorzuziehen. Letzteres besteht darin, daß die Schnitte auf dem Glimmerplättchen in einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure geglüht werden. — Übrigens lassen sich störende Verkohlungsreste aus den Kieselskeletten oft durch vorsichtiges Durchsaugen von Salpetersäure entfernen.

Auf Anregung von Sachs beschäftigte sich Miliarakis[2]) mit dem Nachweis und der Herstellung von Kieselskeletten. Seine Methode kombiniert die 1863 von Pollender zu gleichem Zwecke vorgeschlagene Chromsäure mit konz. Schwefelsäure. Das zu untersuchende Material wird in toto in einem Becherglase mit konz. Schwefelsäure behandelt, bis es schwarz geworden ist, oder falls zarte Blätter vorliegen, bis diese durchsichtig geworden sind. Nun wird eine 20%ige wässerige Chromsäurelösung zugefügt. Die Pflanzenstücke zerfallen unter heftiger Gasentwicklung. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird mit destilliertem Wasser aufgefüllt, absetzen gelassen und nach vorsichtigem Abgießen der Flüssigkeit der pulverige Bodensatz in Untersuchung genommen. Im allgemeinen wird man die Reaktion auf dem Objektträger vornehmen und Präparate und nicht Pflanzenstücke verwenden. Die Schnitte kommen unter Deckglas in konzentrierte Schwefelsäure, nach einiger Zeit wird 20% Chromsäure zugefügt, schließlich eine konzentrierte Chromsäurelösung, dann wird mit Wasser, event. mit Alkohol vorsichtig ausgewaschen.

Bei diesem Verfahren ist eine Glasbildung, bestehend aus Produkten der Kieselsäure mit Kalk-Magnesia-Salzen, die bei dem Glühen in Schwefelsäure auf Platinblech oder dem Glimmerplättchen häufig zu beobachten ist und welche die feinere Struktur der Skelette verwischt, ausgeschlossen. Anderseits wurde schon von Miliarakis, besonders aber von Kohl[3]) hervorgehoben, daß das Verfahren nur bei starker Verkieselung zusammenhängende Skelette liefert, während zarte Kieselskelette völlig aufgelöst werden. Um diesen Übelstand zu vermeiden, hat man nur nötig, mit dem Chromsäurezusatz vorsichtig zu sein und bei geringen Mengen Kieselsäure die Reaktion stets unter Deckglas vorzunehmen. Man setzt nach Einwirkung der Schwefelsäure zunächst eine 5%ige Chromsäurelösung zu, wäscht nach 1—2 Stunden mit

[1]) A. Zimmermann, Mikrotechnik, S. 53.

[2]) Spyridion Miliarakis, Die Verkieselung lebender Elementarorgane bei den Pflanzen, Dissertation Würzburg 1884.

[3]) F. G. Kohl, Anatomisch-physiologische Untersuchung der Kalksalze und Kieselsäure, Marburg 1889, S. 226.

Wasser aus und kontrolliert den Erfolg unter dem Mikroskop. Bei zu schwacher Einwirkung erfolgt nochmaliger Zusatz einer stärkeren Chromsäurelösung. Man gelangt derart stets zum Ziele. Die Reaktion ist bei einiger Übung leicht auszuführen und liefert, im Gegensatz zu dem Veraschungsverfahren, Präparate, die frei von störenden Verkohlungsresten sind.

Es war oben die Vermutung ausgesprochen, daß bei den der Wand anhaftenden, ins Zellumen hineinragenden Kieselkörpern die Zellulosegrundsubstanz (entgegen der Ansicht von Kohl) zuweilen übersehen worden ist. Bei Cyperus alternifolius (Blattepidermis) schlug Zimmermann[1]) zur Erkennung der Zellulose das von Mohl (a. a. O.) benutzte Verfahren ein. Ein Platintiegel wird mit 3 g Flußspat und 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure beschickt. Darauf wird ein mit Wasser gefüllter Platinlöffel eingestellt, welcher die Schnitte enthält. Das Ganze gelangt auf einen Paraffinofen bei etwa 65°. Nach drei Stunden ist die Kieselsäure gelöst, denn das die Schnitte enthaltende Wasser hat genügend Flußsäure zur Lösung der Kieselsäure aufgenommen. Nach dem Auswaschen färbte Chlorzinkjod das Zellulosegerüst blau.

Bei sehr zarten und kieselsäurearmen Blättern (Rubiaceen) verkohlt Netolitzky[2]) die Schnitte nur, laugt mit destilliertem Wasser die das Schmelzen begünstigenden Alkalien aus, fügt Salzsäure zu, verjagt diese und untersucht in Wasser und nach völligem Eintrocknen. Die Skelette lassen sich mit Methylenblau färben. Auch mit Safranin, ebenfalls in essigsaurer oder neutraler Lösung, kann gefärbt werden. Beide Farbstoffe färben nur die Kieselsäure und nicht Tonerde und Kalk[3]). Mit dieser Methode habe ich recht gute Erfahrungen gemacht und konnte sie auf dem Deckglase durchführen, wenn die Präparate in eine Ecke desselben gebracht wurden.

In vielen Fällen begnügt man sich mit den angeführten Reaktionen, zumal dann, wenn der Aschenrückstand weiß und unlöslich in Schwefelsäure ist. Besteht das Kieselskelett aus reiner Kieselsäure, dann darf es sich nur in Fluorwassserstoffsäure lösen. Die Reaktion mit dieser Säure ist umständlich, erfordert mehrere Vorsichtsmaßregeln und ein subtiles Arbeiten. Zunächst muß das Objektiv geschützt werden, indem

---

[1]) A. Zimmermann, Über eigenartige verkieselte Membranverdickungen im Blatte von Cyperus alternifolius, Beitr. z. Morph. u. Physiol. d. Pflanzenzelle, 1893, Heft III, S. 306.

[2]) F. Netolitzky, Verkieselungen bei den Rubiaceae Galieae, Öster. bot. Ztschr., 1911, LXI, Nr. 11.

[3]) S. Keisermann, Kolloidchem. Beih., I, S. 423. — Haushofer empfahl bereits Fuchsinlösung zum Nachweis der amorphen, gelatinösen Kieselsäure, Mikr. Reakt., 1885, S. 121.

man diesem mittels Kanadabalsam ein Stückchen Gelatine (Gelatina alba, Handelsware) aufklebt. Flußsäure ätzt bekanntlich Glas, kommt in Kautschukflaschen in den Handel, läßt sich auch in Merckschen Perhydrolflaschen aufbewahren und wird mit Platindraht auf den Objektträger gebracht. Letzterer wird durch eine dünne Schicht Kanadabalsam, Leim, geschmolzenen Paraffins oder Vaseline geschützt. Kärner[1]) legt zum Schutz auf den Okjektträger ein Stück durchsichtigen Waschbarchentstoff, das vorher durch Reiben mit den Händen etwas erwärmt und geglättet wurde. Man kann auch den Objektträger mit einer dünnen Wachsschicht (Cera alba) überziehen. Rein weiße Kieselskelette lösen sich in Flußsäure innerhalb kurzer Zeit auf. In der durch Flußsäure bewirkten Lösung des Kieselskelettes ruft Zusatz von Natriumchlorid Bildung von Kieselfluornatrium-Kristallen hervor. Da aber das Abheben des Gelatine-Deckplättchen schwer durchführbar ist, so fügt man der Kieselsäure-Asche von vornherein Flußsäure zu, die mit etwas Natriumchlorid versetzt ist. und läßt langsam abdunsten. Die Kieselfluornatrium-Kristalle sind hexagonale Prismen, Pyramiden, Tafeln, sechsstrahlige Sterne und Rosetten[2]).

Kalium.

Kalium gehört zu den für höhere Pflanzen unentbehrlichen Elementen. Im Samen ist es hauptsächlich im Embryo und im Nährgewebe enthalten. Der Kaligehalt der Asche der Samen beträgt meist über 20 %, selten weniger (Piper nigrum 7 %). In der Rinde nimmt der Prozentgehalt mit dem Alter überwiegend ab, doch erscheint es fraglich, ob diese Abnahme auch eine absolute ist. Die Rindenasche führt durchschnittlich 3—8 % Kali. Kalireich sind die Rinden der Chinchonen (Zweigrinden) und von Daphne mezereum, arm an Kali die von Ulmus Corylus u. a. Im Holze zeichnet sich der Splint durch hohen Kaligehalt aus. In der Asche des Holzes finden sich 15—25 %, doch auch 30—45 % Kali (Abies pectinata, Quercus). Reich an Kali sind die Blätter (30—55 %), vornehmlich die jugendlichen, später ist die Zunahme anderen Mineralstoffen gegenüber im allgemeinen gering. Über die Rolle des Kaliums im Stoffwechsel liegen erwiesene Befunde nicht vor, doch ist man allgemein der Ansicht, daß es sich an den wichtigsten Umsätzen und Vorgängen der Zellen beteiligt (beim Abbau und Aufbau des Eiweißes und beim Zustandekommen des Turgors, beim Abbau der Kohlehydrate, also bei der Atmung). Weevers hat gezeigt, daß die Hauptmenge in den Vakuolen auftritt und daß das Cytoplasma gleichfalls Kaliumionen führt, während Zellkern, Chromatophoren, Chlorophyll kein Kalium enthalten von

[1]) W. Kärner, Über den Abbruch und Abfall pflanzlicher Behaarung und den Nachweis von Kieselsäure in Pflanzenhaaren, Nova Acta Acad. Leop.-Carol., 1889, LIV, S. 219.

[2]) K. Haushofer, Mikroskopische Reaktionen, Braunschweig, 1885, S. 98.

Stoklasa wird Kalium im Chlorophyll angegeben). Kalireich sind Reservestoffbehälter, Vegetationspunkte, Siebteil und Parenchym (im Holz die Markstrahlen), arm an Kalium die wasserleitenden Elemente. — Den Cyanophyceen fehlt Kalium.

Der Kaliumnachweis in den Präparaten hat einmal mit der Menge des anwesenden Kaliums zu rechnen und ist auch in einigen Fällen von der Art der Bindung desselben abhängig. Große Quantitäten von Kalium führen sinigrinhaltige Objekte, in denen neben den Nitraten, Sulfaten und Chloriden des Kaliums auch das glykosidische Kalium in Reaktion tritt. Sinigrin führende Präparate können daher, neben dem Mesophyll der meisten Blätter, Siebteilen, Endosperm als erste Übungsobjekte dienen. Legt man einen Schnitt der Meerrettigwurzel trocken auf den Objektträger und fügt Platinchlorid hinzu, so entstehen momentan reguläre Oktaeder von Kaliumplatinchlorid, sowohl in den Zellen (Sinigrinzellen) als auch auf dem Präparateund im Beobachtungstropfen. Würfel entstehen selten; bei den Oktaedern fällt es auf, daß viele nur auf einer Hälfte zur Ausbildung gelangen. Auch Kombinationen von regulären Würfeln und Oktaedern sind nicht selten (Fig. 26). Häufig treten verzerrte Formen von sechsseitigem Umriß auf. Die Kristalle lösen sich unter Deckglas schwer in Wasser und in Alkohol, erst bei wiederholtem Durchsaugen von Wasser werden sie angegriffen. Sie vertragen ferner Zusatz von Glyzerin, lösen sich aber in Chloralhydratlösung, sowie in warmem Wasser. Gegenwart größerer Mengen von Pflanzensäure erschwert die Kristallisation. Außer dem Kalium treten zugleich die etwa anwesenden Salze von Rubidium, Caesium und Ammonium in Reaktion. Zu berücksichtigen sind in der Praxis nur Ammoniumverbindungen. Von der Anwesenheit etwaiger Ammoniumverbindungen hat man sich mit dem Nesslerschen Reagens zu überzeugen; auch kann man die Platinchloridverbindungen des Kaliums von denen des Ammoniums mit Hilfe der Borodinschen Methode unterscheiden. Um aber bei der Reaktion Ammoniumverbindungen sicher auszuschließen, muß man die Präparate veraschen. Die Asche wird nach dem Vorgange Schimpers in einen

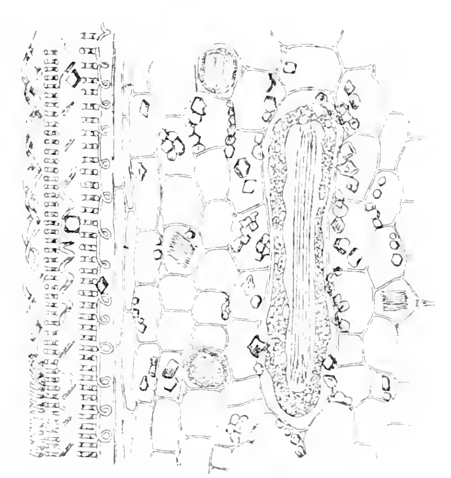


Fig. 26. Urginea maritima (Zwiebelblatt, Längsschnitt), Kaliumnachweis mit Platinchlorid (Tunmann).

Tropfen angesäuerten Wassers gelöst, bis zum Trocknen erwärmt und vor oder nach dem Erkalten Platinchlorid zugesetzt. Selbstverständlich muß das Platinchlorid auf Reinheit geprüft werden, vor allem frei von Kalium sein. Im wässerigen Auszug der Asche scheiden sich häufig große Würfel aus, die Chlorkalium darstellen. Bringt man einen Tropfen Platinchlorid daneben und führt vorsichtig mit dem Platindraht eine Spur davon zum Kristall, so zerfällt dieser sofort in ein Haufwerk roter Körnchen.

Meist ist der Kaliumgehalt der Präparate ein geringer. Man erwärmt dann die Präparate auf dem Objektträger bis zum Eintrocknen und tropft auf den noch warmen Objektträger Platinchlorid auf. Auch bei Wurzelausscheidungen kann man Kalium direkt nachweisen, indem

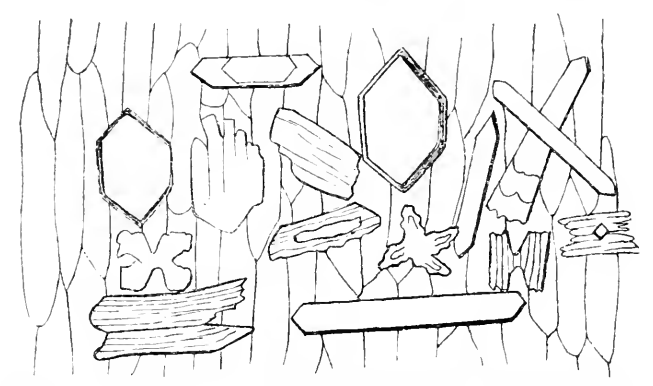


Fig. 27. Cochlearia armoracia (Wurzel, Längsschnitt des Markes), Kaliumnachweis mit Weinsäure und nachfolgendem Alkoholzusatz (Tunmann).

man die Flüssigkeit verdunsten läßt, einen Tropfen Platinchlorid zufügt und bedeckt (Czapek)[1]. In dem Rückstand des Sekretwassers von Phaseolus- und Malvaceenblättern wies Nestler[2]) Kalium mit verdünnter Salzsäure als Chlorkalium sowie mit Platinchlorid nach: wahrscheinlich tritt dort kohlensaures Kali auf, denn der Rückstand, der federartige Bildungen zeigt, ist sehr hygroskopisch und bei Zusatz von Salzsäure erfolgt starke Gasentwicklung. In Glyzerinpräparaten scheiden sich bisweilen Kaliumkristalle aus. Belzung[3]) stellte derart bei Cucurbita pepo stäbchen- und tafelförmige Kaliumnitratkristalle fest.

[1]) Fr. Capek, Zur Lehre v. d. Wurzelaussch., Jahrb. f. wiss. Bot., 1896, XXIX, S. 321.

[2]) A. Nestler, Die Sekrettropfen an den Laubblättern von Phaseolus multiflorus Willd. u. d. Malvaceen, Ber. d. bot. Ges., 1899, XVII, S. 332.

[3]) E. Belzung, Sur divers principes issus de la germ. et leur crist. intercellul., Journ. de Bot., 1892, VII, S. 49.

Bisweilen liefert eine wässerige Weinsäurelösung (1 : 10) gute Dienste. Es bilden sich hexagonale Täfelchen, Platten und Schollen von Kaliumtartarat (Fig. 27). Der Weinsäurelösung bediente sich beispielsweise Guignard beim Nachweis des myronsauren Kaliums (s. Senfölglykoside). Anwesende Ammoniumverbindungen treten gleichfalls in Reaktion, können aber durch Veraschen der Präparate ausgeschlossen werden. Gleichzeitig wird Natrium mitgefällt. Trotzdem läßt sich die Reaktion zum Kaliumnachweis auch bei Schnitten verwenden, wenn man die von Schoorl[1]) bei reinen Substanzen gemachten Erfahrungen berücksichtigt. Das in Weinsäure liegende Präparat wird bis zum Kochen erhitzt, der noch heißen Lösung am Deckglasrande Alkohol zugesetzt, dann werden einige Tropfen Alkohol durchgesaugt. Dadurch wird sämtliches Kalium als Tartarat ausgefällt, das Natriumtartarat aber entfernt. Eine Lokalisation ist jedoch nicht zu ermitteln und, wie ich finde, selbst in der Kälte nicht. Die Kristalle polarisieren lebhaft (die typischen tiefblau und goldgelb) und lösen sich nicht in alkoholischer Chloralhydratlösung (gehen zum Teil in federartige Skelette über). Chloralalkoholat kann somit bei vorsichtigem Zusatz zum nachträglichen Aufhellen der Schnitte dienen.

Einige Kaliumsalze zeigen in Farbstofflösungen ein recht charakteristisches Verhalten. Kaliumsulfat scheidet in einer Lösung von Bismarckbraun fasrige, stark dichroitische Kristalle ab, Kalisalpeter bildete in Nigrosinlösungen violette dichroitische Säulen (Retgers)[2]). Das Verfahren muß erst näher bei pflanzlichen Präparaten ausprobiert werden. Einige Objekte, die stark kaliumhaltig waren, gaben nur einen kleinkörnigen oder flockigen Niederschlag.

Die empfindlichste Reaktion ist jedoch die mit Kobaltnitrit resp. mit Kobaltnitrat, die zum Kaliumnachweis in der Zelle zuerst von Macallum[3]), in ausgedehnter Weise neuerdings von Weevers[4]), benutzt wurde. 20 g Kobaltnitrat und 25 g Natriumnitrit werden in 10 ccm Eisessig und 65 ccm Wasser gelöst. Nach Beendigung der Stickstoffperoxydbildung wird auf 100 ccm aufgefüllt, mehrere Stunden absetzen gelassen (hierbei scheidet sich ev. im Natriumnitrit vorhanden gewesenes Kalium ab) und filtriert. Diese Natriumkobaltnitritlösung gibt mit Kaliumsalzlösungen einen feinen kristallinischen gelben Niederschlag von Kaliumkobaltnitrit, der im Gewebe jedoch meist schwer zu

[1]) N. Schoorl, Beitr. z. mikrochem. Analyse, Wiesbaden, Sep. aus Ztschr. f. analyt. Chem., 46.—48. Bd.

[2]) J. W. Retgers, Über die künstl. Färb. v. Krist. org. Körp. mittels org. Farbst., Ztschr. f. phys. Chem., 1893, XII, S. 600.

[3]) A. B. Macallum, Journ. of physiol. 1905.

[4]) Th. Weevers, Unters. über die Lokalisation und Funktion des Kaliums in der Pflanze, Rec. d. Trav. botan. Néerl., 1911, VIII, S. 289.

erkennen ist. Um den Niederschlag deutlich erkennen zu können, wird er in schwarzes Kobaltsulfid übergeführt. Kaliumkobaltnitrit löst sich leicht in Wasser von Zimmertemperatur, ist aber in Eiswasser (1—4°) unlöslich. Die Präparate, die einige Minuten in der Natriumkobaltlösung gelegen hatten, werden daher mit Eiswasser ausgewaschen (zur Entfernung des überschüssigen Reagens) und dann in ein Gemisch von gleichen Teilen Glyzerin und Ammoniumsulfid übertragen (letzteres kann man durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in Ammoniaklösung, spez. Gew. 0,96, leicht selbst herstellen). Auf diese Weise ist das schwer erkennbare gelbe Kaliumkobaltnitrit am Orte seiner Fällung in

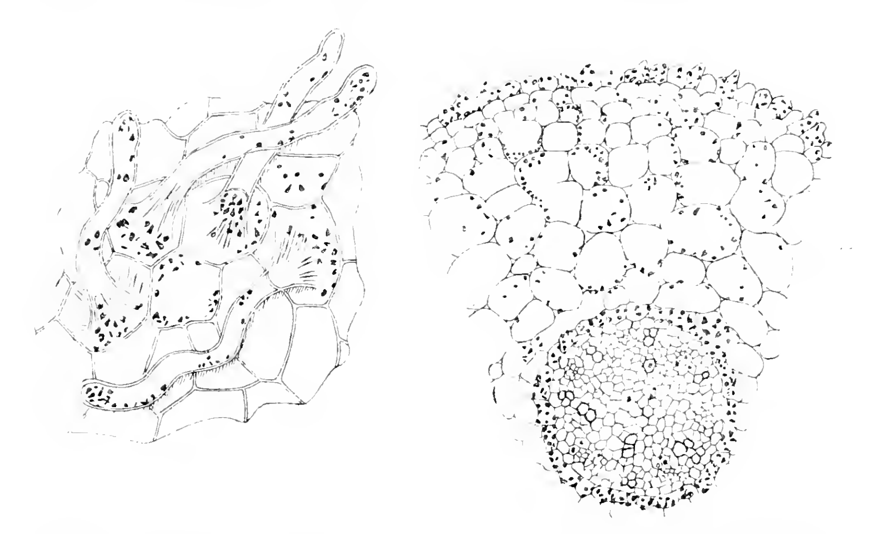


Fig. 28. Orchis spec. (2 mm starke Wurzel, Epidermis und Querschnitt). Kaliumnachweis mit Kobaltnitrat, Umsetzung des Niederschlages mit Ammoniumsulfid in Kobaltsulfid, welches eingezeichnet ist (Tunmann).

das schwarze kristallinische Kobaltsulfid übergeführt. Im allgemeinen durchdringt die Natriumkobaltnitritlösung schnell die Zellmembran, anderenfalls läßt sich das Eindringen des Reagens durch Erwärmen auf 60—70° beschleunigen. Fast stets entsteht die Fällung im Cytoplasma (auch in plasmolysierten Zellen), sehr selten in den Zellsaftvakuolen, doch ist diese Lokalisierung eine sekundäre Erscheinung und zeigt die Berührungszone der in Reaktion tretenden Flüssigkeiten an. Im allgemeinen ist die Fällung in der Zelle gleichmäßig verteilt; findet an einer Stelle eine Anhäufung statt (Spitzen der Wurzelhaare), so beruht diese auf dem leichteren Eindringen des Reagens an der betreffenden Stelle (Fig. 28).

Natrium.

Über die Aufgabe des Natriums sind wir erst mangelhaft unterrichtet. Das Kalium kann Natrium nicht ersetzen. Typische Natronpflanzen (Salsola) können auch bei Abwesenheit von Chlornatrium zu normalen Pflanzen erzogen und zur Fruchtbildung gebracht werden. Selbst bei Landpflanzen ist der Natriumgehalt sehr vom Boden abhängig und weist große individuelle Schwankungen auf. Am reichlichsten findet sich Natrium in der Asche der Blätter, weit weniger ist in Rinde und Holz zugegen, relativ mehr im Splint, und auch die Samenasche führt selten mehr als 2 %. Nach Osterhouts Untersuchungen[1]) ist Natrium den Pflanzen als Schutzstoff nützlich, für manche Meeresalgen als Schutzstoff unentbehrlich.

Zum Nachweis von Natrium bedient man sich einer konzentrierten wässerigen Lösung von Uranylazetat (Streng, Schimper)[2]). Der Schnitt gelangt direkt in das Reagens, das Präparat wird aber nicht mit dem Deckglase bedeckt, sondern vor Staub geschützt zum Eintrocknen hingelegt, event. im Exsikkator nachgetrocknet. Bei Gegenwart von Natrium scheiden sich typische Kristalle von Natrium-Uranylazetat aus. Die kleineren Kristalle sind farblos, die größeren schwach gelb; es sind Tetraeder und Rhombendodekaeder, die im polarisierten Lichte nicht leuchten und sich leicht von dem gleichfalls ausscheidenden Reagens (Uranylazetat, große rhombische tafelartige Gebilde, die bei gekreuzten Nicols leuchten) scharf abheben (Fig. 29). Die Kristalle der Natriumverbindung zeichnen sich durch ihre dunklen Flächen aus: nach längerem Liegen an der Luft erscheinen sie bei durchfallendem Lichte fast schwarz. Zuweilen ist es ratsam, die Schnitte zuvor mit einer Spur Essigsäure zu befeuchten. Bei Anwesenheit von Magnesium resultieren keine Tetraeder, sondern

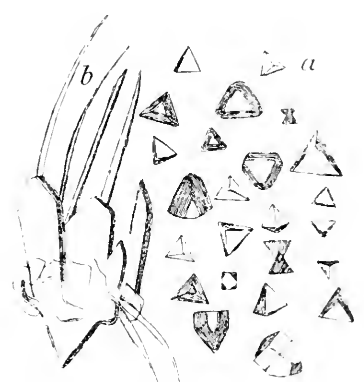


Fig. 29. Natriumnachweis, *a*) Kristallfällungen mit Uranylazetat in Schnitten von Fucus spec., *b*) ausgeschiedenes Uranylazetat (Tunmann).

---

[1]) W. J. V. Osterhout, Die Schutzwirkung des Natriums für Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1909, XLVI, S. 121.

[2]) A. Streng, Über eine neue mikroskopisch-chemische Reaktion auf Natrium, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, S. 129 und: A. F. W. Schimper, Zur Frage der Assimilation der Mineralsalze durch die grüne Pflanze, Flora, 1890, LXXIII, S. 215.

rhomboedrische Kristalle von Uranylmagnesium-natriumazetat. Daher läßt sich auch Uranylmagnesium-azetat als Reagens verwenden. Vorwiegend entstehen die Fällungen außerhalb der Zellen.

Uranylazetat muß frei von Natrium sein. Wenn das Reagens gegenwärtig auch von Merck, Kahlbaum u. a. in vorzüglicher Beschaffenheit zu beziehen ist, so scheint immerhin eine Prüfung auf Reinheit nicht überflüssig zu sein. Spuren von Natrium werden entfernt, indem man Uranylazetat in absolutem Alkohol löst, die Lösung filtriert und eindampft. Ein reines Präparat erhält man ferner, wenn man die Lösung der Handelsware mit Schwefelammonium fällt, das gebildete Schwefeluran gut auswäscht, in Essigsäure löst und das sich abscheidende Uranylazetat umkristallisiert. Zum Aufbewahren der Uranlösung lassen sich mit Vorteil Mercksche Perhydrolflaschen verwenden, da die Lösung aus dem Glase des Gefäßes leicht Natrium aufnehmen kann. Am einfachsten ist es, die erforderliche Lösung aus dem gelben kristallinischen Pulver in einem Tropfen stark verdünnter Essigsäure auf dem Objektträger jedesmal frisch zu bereiten und keine Lösung vorrätig zu halten.

Nach Schoorl[1]) erweist sich in der Chemie Ammoniumuranylazetat als ein ausgezeichnetes Reagens, welches noch 0,01 μg Natrium anzeigt (Bildung von Tetraedern). Ist aber gleichzeitig viel Kalium zugegen, so muß dieses zuvor entfernt werden. Die Kristalle können weiter nach dem Borodinschen Verfahren identifiziert werden. In der Asche wird Natrium auf gleiche Weise nachgewiesen. Nach dem Ausziehen der Pflanzenasche mit Wasser scheiden sich beim Eintrocknen des Auszuges häufig große farblose Würfel ab, die aus Chlornatrium bestehen, deren Natrium ebenfalls mit Uranylazetat nachgewiesen wird.

Bereits in der reinen Mikrochemie ist der sichere Nachweis des Natriums schwierig. Im Gewebe wird er oft unmöglich und man muß zum Veraschen greifen und mit Uranlösung prüfen. Die anderen Reaktionen versagen überwiegend, da stets Kalium mitgefällt wird und die beim Eintrocknen sich ausscheidenden Kristalle der Kalium- und Natriumverbindungen wenig charakteristisch ausfallen und morphologisch kaum zu unterscheiden sind. Als Hilfsreaktion läßt sich, wenn auch nicht immer mit gleichem Erfolg, Platinchlorid verwenden. Während die typischen kleinen Kristalle von Kaliumplatinchlorid (S. 107) sich bereits im Reagenztropfen abscheiden, bilden sich die weit größeren, flachen, schief auslöschenden Tafeln und Prismen von Natriumplatinchlorid erst nach Verdunsten der Lösung.

Ammonium

Als Stickstoffquelle für die jedenfalls in den grünen Laubblättern vor sich gehende Eiweißsynthese kommen neben den Nitraten des Bodens auch Ammonium-

[1]) N. Schoorl, Chem. Weekbl., 1911, VIII, S. 266.

salze in Betracht, die in den wasserleitenden Geweben in die Blätter geleitet werden. Gegenüber den Ammoniumverbindungen des Bodens sind die Ammoniakquantitäten der Luft von untergeordneter Bedeutung. Doch sollen (A. Mayer und L. Koch) die Blätter kleine Mengen Luftammoniak aufnehmen können. Daß die Wurzelhüllen der Orchideen Luftammoniak aufnehmen, war bereits älteren Untersuchern bekannt, und für Odontoglossum Barkeri hat Goebel (1889) die Absorption von Luftammoniak experimentell nachgewiesen. Im allgemeinen ist aber die Aufnahme von Ammoniumverbindungen recht gering, größere Mengen nehmen nur säureliebende Pflanzen, besonders Sumpfpflanzen, auf[1]. Anderseits wird bei der Spaltung der Eiweißkörper durch proteolytische Enzyme neben Monoaminosäuren und Hexobasen Ammoniak gebildet. In Keimpflanzen (Pisum, Cucurbita, Lupinus) wird Ammoniak wahrscheinlich zur Bildung von Asparagin und Glutamin verbraucht. Ammoniumsalze müssen vornehmlich im Stengel zugegen sein; Anhäufung von Ammoniak scheint aber für die Pflanze nicht günstig zu sein[2]. Bei Pilzen ist Ammoniakbildung experimentell festgestellt, bei Schimmelpilzen aus Aminosäure, bei Azotobakter aus Nitraten, bei Bacillus subtilis aus Nitriten.

Eine eingehende mikrochemische Untersuchung über die Ammoniumverbindungen steht noch aus. Man bedient sich meist des von Strasburger[3]) zuerst für mikrochemische Zwecke benutzten Nesslerschen Reagens, welches freies und gebundenes Ammoniak anzeigt.

Die Zusammensetzung des Reagens schwankt etwas. Nach Strasburger wird Jodkalium und Quecksilberchlorid in etwas Wasser gelöst, das gebildete rote Quecksilberjodid durch überschüssiges Kaliumjodid in Lösung gebracht und der Lösung einige Tropfen reiner Kalilauge zugesetzt. Benutzt man das Nesslersche Reagens in der Zusammensetzung, wie es in der Chemie Anwendung findet (am besten nach E. Schmidt[4]), 2,0 g Jodkalium, 5,0 g Wasser, 3,2 g Quecksilberchlorid oder soviel, daß beim Erwärmen etwas ungelöst bleibt; nach dem Erkalten wird die Lösung mit 20,0 g Wasser verdünnt, filtriert und mit 40,0 g Kalilauge — 13,4 g Kalium causticum und 26,6 g Wasser — versetzt), dann fallen die Reaktionen etwas abweichend aus, denn durch den Kalilaugeüberschuß geben die Ammoniumsalze Ammoniak frei, der nun neben dem freien Ammoniak in Reaktion tritt.

Bei Gegenwart geringer Mengen Ammoniak entsteht mit Nesslerschem Reagens sofort eine gelbe Färbung, die (und dies ist zu beachten) in einiger Zeit in eine gelbliche Fällung übergehen muß, jedenfalls nicht, ohne ein körniges Gerinnsel zu hinterlassen, verschwinden darf.

---

[1]) P. Ehrenberg, Mitt. landw. Inst. Breslau, 1907, IV, S. 254.

[2]) Zalewski, Ber. bot. Ges., 1907, XXV, S. 357; Schulze, Loew, Castoro u. a.

[3]) E. Strasburger, Bot. Praktikum, III. Aufl., 1897, S. 141. — M. Molliard, Sur la formation d'ammoniaque par les tissus végétaux privés d'oxygène, Bull. Soc. bot. de France, 1909, LVI, S. 332.

[4]) E. Schmidt, Pharm. Chemie, 1898, I, S. 133.

Bei Anwesenheit größerer Mengen folgt der Gelbfärbung innerhalb weniger Minuten ein brauner Niederschlag. Versuchsobjekte sind die Stengel der Helianthus-Arten, vorzüglich das persistente periphere Markparenchym. Hier läßt sich die Reaktion mit bloßem Auge verfolgen, wenn man den Objektträger über eine weiße Unterlage hält. Durch weitere Reduktion wird die braune Fällung nach einiger Zeit in ein dunkles Gerinnsel übergeführt, das makroskopisch grau, mikroskopisch schwarz erscheint. Der flockig-körnige Niederschlag sammelt sich an den Zellwänden an. Der Nachweis mit dem Nesslerschen Reagens ist keineswegs eindeutig. Nickel[2]) zeigte, daß viele organische Verbindungen die gleiche oder doch eine ähnliche Reaktion geben. Zuweilen bestehen Unterschiede in der Endphase der Reaktion. In vitro werden Aldehyde rotbraun, zuletzt grau, Ammoniaksalze aber anfangs gelb, schließlich gelbrot. Im Gewebe können auch Saponine[1]), selbst Zucker Anlaß zu Irrtümern geben. Auf die Gelbfärbung ist ebenfalls wenig Gewicht zu legen, denn Hesperidin wird durch den Alkaligehalt des Reagens mit intensiv gelber Farbe gelöst.



Fig. 30. Helianthus annuus (Mark). Fällungen bei Alkoholzusatz, zum Teil Ammoniumsalze: rechts zwei nativ vorkommende Oxalate (Tunmann).

Läßt man auf frische Schnitte von Helianthus-Stengel Alkohol einwirken, dann scheiden sich innerhalb weniger Minuten zahlreiche Kristalle aus, teils kleine Stäbchen und Tafeln, teils X-förmige Skelette, die sich zu drusenförmigen Gebilden vereinen. Zuweilen kommt es zur Bildung federartiger Kristallgruppen, die sich in einigen Zellen anhäufen. Diese Kristalle, die sich leicht in Wasser lösen, reagieren positiv mit Nessler. Sie bestehen wahrscheinlich aus Ammoniumsalzen (Fig. 30). Alkohol käme somit beim Ammoniumnachweis als Hilfsreaktion in Betracht. Tragen wir die Präparate statt in Alkohol direkt in eine alkoholische Lösung von Nigrosin ein, dann erscheint eine Anzahl der Kristalle mehr oder weniger bläulich bis violett. Ein Teil der Kristalle bleibt farblos, ebenso das nativ auftretende Kalziumoxalat.

[1]) E. Nickel, Die Farbenreaktionen der Kohlenstoffverbindungen, Berlin 1890.

[2]) Bei Saponinpflanzen ist nach eigenen Erfahrungen Nesslers Reagens wenig brauchbar.

Diese Reaktion stimmt mit den Befunden von Retgers[1]) überein, nach dem Ammoniumnitrat den Farbstoff aus Indulin- und Nigrosinlösungen aufnimmt. Im Gewebe fällt die Reaktion nicht so klar aus, wie mit reinen Substanzen, da sich andere Körper mehr oder weniger mitfärben.

Mit Weinsäure hat Dębski[2]) in Marantaceen Ammonium nachgewiesen.

Bei der Unsicherheit der genannten Reaktionen wäre weiterhin Magnesiumsulfat und Natriumphosphat zu benutzen, welche Haushofer[3]) empfahl. Die Schnitte müssen mit einer Spur verdünnter Natronlauge alkalisch gemacht werden. Bei Helianthus waren die Erfolge allerdings nicht befriedigend, die Kristalle fielen sehr schlecht aus.

Kalzium.

Kalzium zählt zu den unentbehrlichen Elementen grüner Pflanzen. Pilze können ohne Kalzium gedeihen und für einige Sumpf- und Wasserpflanzen sind Kalziumverbindungen giftig. Für die meisten Pflanzen ist Kalk jedoch von großer Bedeutung, über die aber noch nicht völlige Klarheit herrscht. Verschiedentlich schrieb man dem Kalzium eine Funktion beim Transport der Glykosen zu, da bei Kalziummangel Störungen im Stofftransport beobachtet wurden. Doch diosmieren Kalkglykosen nicht besser als reine Glykosen. Eine wichtige Aufgabe des Kalziums besteht darin, daß es die Giftwirkung löslicher organischer Säuren unschädlich macht und die Säurebildung in der Pflanze reguliert. Auch bei der Zuckersynthese scheint ihm eine Bedeutung zuzukommen; vielleicht wirkt es als Schutzstoff gegen den bei der Assimilation gebildeten Formaldehyd, dann wäre die Erkrankung kalkfrei gezogener Pflanzen als Formaldehydvergiftung aufzufassen. Auf die Entwicklung der Wurzeln übt es einen günstigen Einfluß aus, in den Blättern steigt der Kalkgehalt im Laufe der Vegetation. Im Holz sind beträchtliche Mengen zugegen. Kalziumabscheidungen können die Elemente im Kern- und Wundholz völlig verstopfen (S. 99). Unter den Aschenbestandteilen des Holzes und der Rinden (besonders der älteren) nimmt Kalzium die erste Stelle ein. Relativ gering ist der Gehalt im Samen, erreicht aber in bestimmten Fällen in der Samen- und Fruchtschale hohe Werte. Es beteiligt sich nicht nur am Aufbau der Zellwände und tritt in großen Quantitäten in anorganischer Bindung auf, sondern ist Bestandteil wichtiger Eiweißkörper (Globoide u. a.), findet sich wohl auch in Zellkern und Chromatophoren.

Die Kalziumkristalle gelangen zum kleineren Teil in der Zellwand zur Ausscheidung. Überwiegend entstehen die Kristalle im Zellinhalt und zwar, wie

[1]) J. W. Retgers, Über die künstliche Färbung von Kristallen organischer Körper mittels organischer Farbstoffe, Ztschr. f. phys. Chem., 1893, XII, S. 600.

[2]) B. Dębski, Über den Bau und Bewegungsmechanismus der Blätter der Marantaceen, Anz. der Krakauer Akad., 1895, S. 244.

[3]) K. Haushofer, Mikr. Reakt., 1885, S. 13.

schon Wakker[1]) zeigte, in den Vakuolen, auch dann, wenn nachträglich eine Verwachsung mit der Zellwand erfolgt. Die Bildung der Kristalle in den Vakuolen läßt sich in vielen Fällen in den jugendlichen Zellen durch Plasmolyse mit 4 % Rohrzuckerlösung ermitteln. Außerdem bedient man sich mit Vorteil einer 10 % durch Eosin rotgefärbten Salpeterlösung. Die Kristalle sind dann stets innerhalb der Vakuole sichtbar. Beim Umlegen des Mikroskopes folgen sie dem Gesetz der Schwere und nehmen die tiefste Stelle in der Vakuole ein.

Zum mikrochemischen Nachweis des Kalziums im Gewebe und in den einzelnen Zellbestandteilen stehen einige Methoden zur Verfügung, die auf der Fällung des Kalziums als Oxalat, Karbonat oder Sulfat beruhen.

Mit Schwefelsäure ist die einfachste Methode des Kalziumnachweises gegeben. Man benutzt eine verdünnte Säure. Eine allgemein gültige Vorschrift für die Konzentration der Säure läßt sich nicht geben, da die schnellere oder langsamere Bildung des Sulfates von verschiedenen Faktoren abhängt, jedenfalls auch von der Art der Bindung des Kalziums. Doch kann es vorkommen, daß die Ausscheidung von Gipskristallen unterbleibt, trotzdem Kalziumkristalle (winzige Oxalate) im Gewebe zugegen sind und zuvor mikroskopisch ermittelt wurden. Dies kann geschehen, wenn die Kalziummenge gering und der Zusatz an Schwefelsäure reichlich ist. Die kleinen Quantitäten von Kalziumsulfat werden von der Schwefelsäure in Lösung gehalten. Kommt es nicht auf Feststellung der Lokalisation an, dann ist es oft ratsam, das Präparat in 5 % Schwefelsäure zu erhitzen und der noch heißen Lösung einige Tropfen Alkohol zuzufügen. Die Abscheidung des Gipses vollzieht sich auf diese Weise schneller und die Kristalle fallen größer aus.

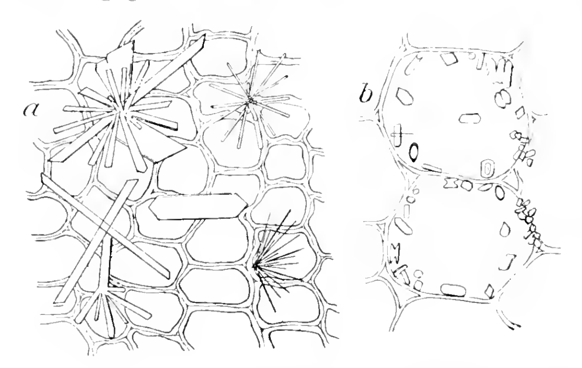


Fig. 31. Kalziumnachweis: *a*) Laminaria Cl. (Schnitt mehrere Tage gewässert, dann 2 % Schwefelsäure), Kalziumsulfatkristalle; *b*) Jatrorrhiza palmata, Wurzel (kristallfreies Holzparenchym des Zentrums). Kalziumoxalatkristalle mit Ammoniumoxalat gefällt (Tunmann).

Der Reaktion haftet der Mangel an, daß sie neben dem Kalzium der Zellinhalte gleichzeitig das der Membranen anzeigt. Allerdings

[1]) J. H. Wakker, Studien über die Inhaltskörper der Pflanzenzelle, Jahrb. f. wiss. Bot., 1888, XIX, S. 423.

läßt sich durch Digerieren der Präparate mit Wasser und durch Alkoholbehandlung das Kalzium aus den Zellinhalten zum größten Teile entfernen (mit Ausnahme von Kalziumoxalaten und -silikaten), so daß Vergleichspräparate einen annähernden Schluß gestatten, inwieweit bei der Sulfatfällung Membran- oder Zellinhaltkalzium beteiligt ist. Eine Verwechslung mit anderen durch Schwefelsäure entstehenden Kristallen ist nicht ausgeschlossen, trotzdem die Gipskristalle eine ungemein typische Form besitzen. Es sind lange Prismen oder tafelförmige Kristalle mit stumpfwinkligen Endflächen. Die Tafeln verwachsen zuweilen zu Zwillingskristallen und zwar derart, daß der Kantenwinkel 104° oder 130° beträgt (Haushofer). Bei Geweben wird man Tafeln relativ selten antreffen (Fig. 31a). Je konzentrierter die benutzte Säure

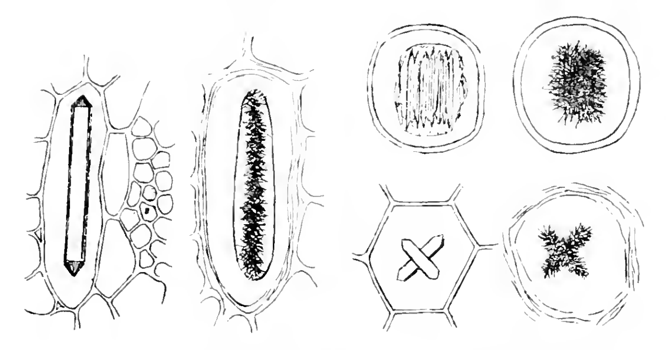


Fig. 32. Kalzium (-oxalat) -kristalle mit konz. Schwefelsäure erhitzt: Bildung von Kalziumsulfat-Anhydrid (Tunmann).

ist, um so schneller erfolgt die Ausscheidung und um so mehr überwiegen Nadeln (die sogenannten Gipsspieße), welche sich sternförmig gruppieren. Werden die Kalzium- oder die Gipskristalle in konzentrierter Schwefelsäure erhitzt, so gehen sie in Anhydrid über und bilden sofort ein wirres Geflecht kleiner feiner Nadeln, welches die Gestalt des ursprünglichen Kristalles noch im Umriß erkennen läßt (Fig. 32). Zuweilen zeigt übrigens die Lage der Gipsnadeln (auf der Membran oder im Zellinhalte) die Herkunft des Kalziums an, wenn die Präparate direkt in Schwefelsäure eingetragen werden. Die Gipskristalle müssen mikrochemisch näher geprüft werden. Sie sind unter Deckglas unlöslich oder doch schwer löslich in Wasser (Gips löst sich in 386 Teilen Wasser bei 18°, geringe Gipsmengen sind unter Deckglas sehr wohl in Lösung zu bringen, besonders bei Gegenwart von Salzsäure oder Salpetersäure) und in Alkohol (Unterscheidung von Alkaloidfällungen u. a.). Chlorbaryumlösung, vornehmlich bei Zusatz von etwas Salzsäure, überzieht die Gipskristalle mit einer Kruste von Baryumsulfat (s. Schwefelsäure).

Ferner kann man die Gipskristalle in weinsauren Kalk überführen. Man saugt die Präparate trocken und fügt einen Tropfen Seignettesalzlösung hinzu. Die Gipsspieße lösen sich und weinsaurer Kalk kristallisiert in starken Prismen aus. Die weinsauren Salze von Baryum und Strontium zeigen die gleichen Kristallformen, sie kommen aber bei Pflanzen nicht in Betracht.

Zum Nachweis des Kalziums in der Pflanzenasche bedient man sich einer verdünnten Schwefelsäure (2—4%). Bei Gegenwart reichlicher Mengen Kalk wird die Säure direkt der Asche zugefügt, bei geringem Kalkgehalt zieht man die Asche mit einem Tropfen Wasser aus, zieht den Tropfen beiseite und läßt ihn mit Zusatz einer Spur Schwefelsäure eintrocknen. War der Kalk als Sulfat in der Asche zugegen, dann erfolgt seine Ausscheidung im Auszuge auch ohne Zusatz von Schwefelsäure.

Während man die Schwefelsäure überwiegend zum Nachweis von Kalziumkristallen und von Membrankalk benutzt, so benutzt man Oxalsäure in erster Linie zur Ermittelung gelöster Kalziumverbindungen. Mit ihrer Hilfe läßt sich auch die Verteilung der Kalziumsalze in der Pflanze studieren. Größere Pflanzenstücke werden nach Acqua[1]) in einer 2% wässerigen Oxalsäurelösung mazeriert, dann mit destilliertem Wasser gut ausgewaschen, schließlich in Alkohol gehärtet und nicht zu dünne Präparate angefertigt. Schimper[2]) bediente sich einer wässerigen Lösung von Ammoniumoxalat, wobei sehr kleine doppelbrechende tetragonale Pyramiden entstehen. Wurden die Schnitte direkt in eine kochende Ammonoxalatlösung eingetragen, dann entstanden ovale Formen des monoklinen Systems. Das Reagens ist sehr empfindlich, bei Benutzung reiner Lösungen wird Kalknitrat noch in einer Verdünnung von 1 : 20000 nachgewiesen. Nachprüfungen zeigten, daß zu den Reaktionen vorteilhaft die Oxalsäure in 2—3%, Ammoniumoxalat in 3—5% wässeriger Lösung benutzt werden. Beide Reagentien liefern die gleichen Kristallformen (Fig. 31b). Eine Verwechslung der Oxalatfällungen bei rein optischer Betrachtung mit eventuellen Ausscheidungen der Reagentien (bei Anwendung konzentrierter Lösungen) ist nicht zu befürchten. Überdies lassen sich die Reagentien durch Auswaschen mit Wasser aus den Schnitten entfernen, während die entstandenen Kalziumoxalate zurückbleiben und ein Aufhellen der Schnitte mit Chloral-

[1]) C. Acqua, Einige Beobachtungen über den Entstehungsort des Kalziumoxalates in den Pflanzen, Malpighia, 1889, III, S. 160. Ztschr. f. wiss. Mikrosk., 1889, VI, S. 544.

[2]) A. F. W. Schimper, Zur Frage der Assimilation der Mineralsalze, Flora, 1890, LXXIII, S. 211.

hydrat gestatten. Ein Nachteil der Reaktion liegt darin, daß die Kalziumoxalatfällungen aus sehr kleinen Kristallen bestehen. Im allgemeinen ist das in der Kälte gefällte tetragonale Kalziumoxalat (3 Mol. Kristallwasser) kleiner als das monokline (1 Mol. Kristallwasser), welches beim Aufkochen fällt. Ersteres ist meist so klein, daß man es bei starker Vergrößerung (600 fach) betrachten muß, und läßt sich gut mit winzigen Stärkekörnchen vergleichen. Im Mark einjähriger Pflanzen erscheinen die chlorophyllfreien, kalkhaltigen Zellen, die nicht angeschnitten wurden, fast schwarz von den zahlreichen Kalziumoxalatkriställchen. Aber auch die größeren, beim Aufkochen erhaltenen Kristalle besitzen nur einen Durchmesser von 10—15 μ. Bei mehrstündigem Liegen erzielt man etwas größere Kristalle. In amylumreichen Geweben (Wurzeln) sind naturgemäß die Fällungen kaum oder doch nur sehr schwer zu erkennen. Am besten wird die Stärke durch Aufkochen verkleistert. Doch müssen die Präparate vorher 15 Minuten im Reagens gelegen haben, so daß das Kalzium bereits kristallinisch ausgefällt wurde und aus den Zellen nicht mehr austreten kann. Schließlich ist es unbedingt erforderlich, Vergleichspräparate zu durchmustern und sich mit Schwefelsäure (1 + 3,0 Wasser) von der Natur der Fällungen zu überzeugen.

Ammoniumkarbonat ist weit weniger empfindlich, daher nur bei kalkreichen Objekten zu benutzen, es wird in 3% wässeriger Lösung gebraucht. Bei Landpflanzen, deren Zellsaft sauer reagiert, fügt man dem Reagens etwas Ammoniak zu (1,0 : 100,0 Reagens). In der Kälte entstehen kleinkörnige, 1 μ große, oft perlschnurartig aneinander gereihte Gebilde; erhitzt man jedoch, dann entwickeln sich regelmäßige Rhomboeder (Durchmesser 4—5 μ), seltener kleine Prismen, die an ihren Enden zur Verzweigung neigen. Die Reaktion verlangt eine sehr kritische Beurteilung. Einmal habe ich die Karbonatfällungen nur sehr selten in charakteristischer Form erhalten und dann entstehen gleichzeitig andere, schwer zu identifizierende Kristalle. Ammoniumkarbonat und Ammoniak reagieren nicht nur mit Gerbstoffen und Magnesium, sondern auch mit verschiedenen Pflanzensäuren (Weinsäure u. a.); man führe die Reaktion einmal an Daucus carota aus. Zum Kalziumnachweis ist das Verfahren nicht empfehlenswert.

Proteinkalk wies zuerst Pfeffer[1]) in seiner berühmten Arbeit über die Aleuronkörner nach, in der eine eingehende mikrochemische Analyse der Globoide ausgeführt wird. Zu den isolierten Globoiden wird eine ammoniakalische Lösung von Chlorammonium und oxalsaurem Ammon zugefügt. Die sich ausscheidenden Kristalle von Kalkoxalat werden weiter identifiziert.

[1]) W. Pfeffer, Jahrb. f. wiss. Bot., 1872, VIII, S. 429.

Zur Unterscheidung von Kalkphosphat und -oxalat, die beide gleichzeitig in den kugeligen Gebilden lebender Zellen einer Cyperus-Art auftreten (s. Phosphorsäure, S. 92), hat Zimmermann[1]) oxalsaures Ammon mit Essigsäure kombiniert, wodurch der an die Phosphorsäure gebundene Kalk gelöst wurde und zugleich in Reaktion trat, während der an Oxalsäure gebundene Kalk jener Sphärite, der den Kern bildet, ungelöst blieb. Die betreffenden Schnitte wurden in 10% Ammoniumoxalat, dem 1% Essigsäure zugesetzt war, erhitzt. Die aus phosphorsaurem Kalk bestehenden Schalen der Sphärite verwandelten sich in Klumpen winziger Kriställchen, die sich nicht in 5% Essigsäure, jedoch leicht in Salzsäure lösten. In einer Lösung von 0,5% Ammoniumoxalat und 1% Essigsäure erfolgt die gleiche Reaktion, zwar erst nach $^1/_2$ Stunde, aber ohne Erwärmen.

Der Nachweis des Kalziums in den Karbonaten kann mit Schwefelsäure geführt werden (Gispnadeln). Die Membran führt aber auch andere Kalkverbindungen (Kalzium-pektate und -oxalate). Speziell bei den **Cystolithen,** bei denen nach Giesenhagen nur kohlensaurer Kalk teils an Zellulose gebunden ist, teils frei auftritt, wendet Zimmermann[2]) stark verdünnte Schwefelsäure an (1%), wodurch sich die Gipsnadeln in der Umgebung der Cystolithen abscheiden. Die Schnitte können auch direkt in eine siedende Lösung eingetragen werden, die 0,5 g oxalsaures Ammon und 1,0 g Essigsäure auf 100,0 Wasser enthält. Es bilden sich stark lichtbrechende drusenartig verwachsene Kristalle von Kalziumoxalat. Bei Anwendung einer kalten konzentrierten Lösung (10% oxalsaures Ammon, 1% Essigsäure) wird aber oxalsaures Ammon in den Cystolithen niedergeschlagen, welche sich bei mikroskopischer Betrachtung nicht verändert zeigen. Wird die konzentrierte Lösung heiß angewandt, dann erhalten die Cystolithen eine körnige Oberfläche, die aus Kalkoxalat besteht, während der Kern noch unverändertes Karbonat enthält. Neben dem Karbonat findet sich in den Cystolithen übrigens Kieselsäure, die aber auf den Stiel und den Kern beschränkt ist. Die Grundmasse der Cystolithen besteht aus Zellulose: die Cystolithen werden nach dem Lösen des Kalkes mit Salzsäure durch Chlorzinkjod violett. In den Blättern der Coccinia-Arten sind im Gerüst der Cystolithen außer Zellulose noch andere Substanzen zugegen, denn man muß nach Avetta[3]), um die Chloridzinkjodreaktion zu erhalten,

[1]) A. Zimmermann, Über Kalziumphosphatausscheidungen in lebenden Zellen, Beitr. z. Morph. u. Physiol. d. Pflanzenzelle, 1893, H. III, S. 311.

[2]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik, S. 60.

[3]) C. Avetta, Über die Cystolithen der Blätter von einigen Coccinia-Arten, Annuario d. R. Ist. Bot. di Roma, 1894, V, S. 181.

die Grundsubstanz zuvor nacheinander mit Salzsäure und Kalilauge behandeln. Übrigens hatte schon vorher Mangin[1]) neben Zellulose Pektinsubstanzen und namentlich Callose nachgewiesen, wie denn Callose in mit kohlensaurem Kalk inkrustierten Wänden häufig vorkommt. Kalkarme Cystolithen verholzen oder verkorken zuweilen. Auch ist zu berücksichtigen, daß es kalkarme, selbst kalkfreie Cystolithen gibt (Goldfussia, Ruellia). Die Strukturverhältnisse lassen sich nach Giesenhagen[2]) am besten an Ficus-Blättern beobachten. Frische Blätter werden von der Epidermis befreit, ein starker Tangentialschnitt wird aus dem freigelegten Gewebe hergestellt und dieser auf Holundermark in Gummiglyzerin eingetragen. Diese Masse dringt in die geöffneten Zellen ein. Nach dem Eintrocknen der Masse sind die Cystolithen fest eingebettet und die Schnitte fallen tadellos aus.

Magnesium.

Magnesium ist für grüne Pflanzen unentbehrlich. Es spielt bei den Synthesen eine hervorragende Rolle (Photosynthese der Chlorophyllkörner, Willstätter). Ausdauernde Gewächse verfahren mit dem Magnesiumgehalt ökonomisch, beim Blattfall wandert das Magnesium des Chlorophyllgrüns in den Stamm zurück (Stahl). Im Samen sind Beziehungen zwischen dem Magnesiagehalt und den gespeicherten Reservestoffen zu erkennen. Aleuronhaltige Samen führen im allgemeinen mehr Magnesia (Amygdalus, 17%) als stärkehaltige. Erstere besitzen bekanntlich Magnesium in den Globoiden der Aleuronkörner. Die Asche der Samenkerne ist reicher an Magnesia als an Kalk (E. Schulze), die gleichen Verhältnisse sind im Mehl, in der Kleie und im Getreide (Weizenmehl 11,22 Magnesia, 6,32 Kalk, Gerstenmehl 13,50 Magnesia und nur 2,80 Kalk, Willstätter). In der Asche des Holzes beträgt der Gehalt an Magnesia 5—10, steigt aber auch bis 20 und 25% (Larix, Quercus, Betula). Die Rindenasche führt hingegen nur 2—6% (Daphne mezereum über 12%). In den Blättern schwankt der Gehalt von Spuren (Gramineen) bis zu 25% (Beta vulgaris) und selbst 28% (Solanum tuberosum).

Von den Methoden, die zum Nachweis von Magnesium im Gewebe benutzt werden können, hat sich diejenige am meisten eingebürgert und am besten bewährt, welche bereits Pfeffer[3]) bei seinen grundlegenden Arbeiten über die Aleuronkörner benutzte und die das Magnesium als Magnesiumammoniumphosphat zur Kristallisation bringt.

[1]) L. Mangin, Sur la constitution des cystolithes et des membranes incrustées de carbonate de chaux, Compt. rend., 1892, CXV, S. 260.

[2]) C. Giesenhagen, Das Wachstum der Cystolithen von Ficus elastica, ein Beitrag zur Kenntnis des Dickenwachstums vegetabilischer Zellhäute, Flora, 1890, LXXIII, S. 1.

[3]) W. Pfeffer, Unters. über d. Proteinkörner u. d. Bedeut. d. Asparagins beim Keimen d. Samen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1872, VIII, S. 429.

Die Kristallformen sind in Fig. 24, S. 88 dargestellt. Pfeffer isolierte die Globoide und versetzte sie unter Deckglas mit einer ammoniakalischen Lösung von Chlorammonium und phosphorsaurem Ammoniak. Schimper (Lit. S. 76, 3) benutzte später eine mit etwas Chlorammonium versetzte Lösung von Natriumphosphat. Die Präparate, die vorher nicht gewässert haben dürfen, werden direkt mit dem Reagens versetzt, worauf sich phosphorsaure Ammoniak-Magnesia in den Zellen in Form charakteristischer, sargdeckelförmiger Kristalle abscheidet. Wenn man in gleicher Weise die Asche einiger Präparate behandelt, dann bilden sich überwiegend X-förmige Kristallskelette.

Die Kristallformen sind wesentlich von der Menge des Magnesiums abhängig (vergl. Fig. 33). Bei Gegenwart größerer Quantitäten entstehen überwiegend Sterne, deren Strahlen federartig ausgebildet sind. In vielen Fällen sind übrigens die zur Kristallbildung nötigen Phosphormengen im Gewebe zugegen, so daß allein Ammoniakzusatz Bildung von Ammoniummagnesiumphosphat veranlaßt. Die Ammoniakreaktion zeigt neben Phosphaten auch Magnesium an.

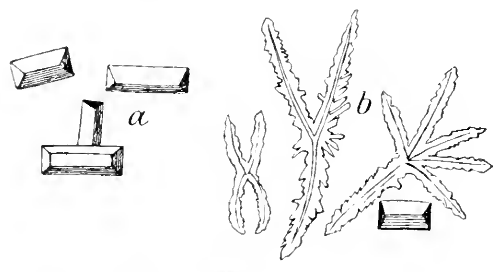


Fig. 33. Kristalle von Magnesiumammoniumphosphat, *a*) aus dem Milchsaft von Lactuca virosa, *b*) aus dem harzigen Sekret von Pinus (Tunmann).

Die eingehenden kritischen Nachprüfungen der gebräuchlichen Methoden durch O. Richter[1]) haben ergeben, daß der Nachweis als Magnesiumammoniumphosphat immer noch der beste ist, wozu sich auch Natriumammoniumphosphat bei Gegenwart von Ammoniak benutzen läßt. Diese Methode benutzte auch Czapek (Lit. s. Kalium, S. 108, 1) zum Nachweis von Magnesia in den Ausscheidungen der Keimwürzelchen. Zur Kontrolle können herangezogen werden: Ammoniumoxalat mit und ohne Essigsäure, Oxalsäure und Zinksulfat, Schwefelsäure mit und ohne Wasser, Kaliumoxalat, Ferrocyankalium und Ammoniak, Seignettesalz und Ammoniak, Kaliumpyroantimoniat, Arsenverbindungen und Ammoniak. Andere Reaktionen sind nicht zu benutzen, es haben somit auch die früher angewandten Reaktionen mit Natriumkarbonat, Natriumkarbonat und Kalzium, Oxalsäure und Essigsäure, Fluorwasserstoffsäure, Uranylazetat u. a. auszuscheiden.

[1]) O. Richter, Beiträge zur Kennt. d. Magnesium-Ammonium-Phosphats, Tschermaks mineral. u. petrograph. Mitteil., 1901, XX, S. 89 und: Untersuchungen über das Magnesium in s. Bezieh. z. Pfl., Sitzber. Wien. Akad., 1902, CXI, 1. Abt., S. 171.

Magnesia-Reaktionen erhält man oft in Pollenkörnern (Althaea rosea, Cucurbita pepo), im Inhalte der Siebröhren und in Milchsäften. Hohen Magnesiumgehalt gibt Schimper für die Milchsäfte von Lactuca virosa, Ficus elastica, Euphorbium und Ammoniacum an (Opium und Olibanum gibt keine Reaktion), und Molisch[1]) für Euphorbia mammilaris und Galactodendron utile. Wenn wir ferner das harzig-ölige Sekret der schizogenen Gänge isolieren und durch Ammoniakzusatz stark alkalisch machen, so erhält man teils sofort, teils erst bei nachfolgendem Zusatz von Natriumphosphat typische Magnesiakristalle. Von 26 untersuchten Sekreten (Coniferen, Compositen und Umbelliferen) gaben 9 schon bei Zusatz von Ammoniak, weitere 7 erst bei nachfolgendem Phosphatzusatz Magnesiareaktion. Demnach fehlen Phosphate im Sekret öfters, während Magnesium meist zugegen zu sein scheint (Fig. 33).

In Agarabkochungen entstehen Magnesia-Ammoniumphosphate möglicherweise durch die Tätigkeit von Pilzen (Eschbaum[2])) oder durch Austrocknung (Richter[3])).

Eisen.

Eisen ist nicht nur für grüne Pflanzen, sondern auch für Pilze unentbehrlich. Wir wissen aber wenig über die Form, in der es in den Zellen auftritt, ob es in organischer Bindung allgemein verbreitet ist (nukleinsaures Eisen). Ebenso wenig geklärt sind die Aufgaben dieses Elementes. Es ist bekannt, daß bei Eisenmangel die grünen Pflanzen bleichsüchtig, chlorotisch, werden und daß Zufuhr von Eisen die Chlorose zu heilen vermag. Doch fehlt Eisen dem Chlorophyllfarbstoff. Bei den Eisenbakterien und vielen Algen (Euglenen, Oscillarien, Oedogonien u. a.) sind die Membranen und Gallertscheiden mit Eisenoxydhydrat imprägniert, wodurch die Pflanzen eine gelbe, oft fast schwarze Farbe erhalten, und die rostbraune Färbung des Thallus mancher Flechten rührt von Eisenoxydulverbindungen her, die zuweilen in Form kleiner Körnchen den Hyphenmembranen an der Außenseite aufgelagert sind; bei einigen Algen sind Eisenausscheidungen auch im Zellinhalte. Im allgemeinen ist der Gehalt an Eisen, den Aschenanalysen zufolge, ein geringer. Wasserpflanzen zeichnen sich durch hohen Gehalt an organischen und anorganischen Eisenverbindungen aus. Abnorm hoher Eisengehalt findet sich in den Fruchtschalen von Trapa natans. Durch geeignete Düngung mit Eisen-Karbonat, -Phosphat u. a. kann der Gehalt sehr gesteigert werden, so daß man sogar auf diese Weise gewonnene stark eisenhaltige Drogen (Spinacia, Rumex) als Arzneimittel empfahl. Eisendüngung ist von Einfluß auf die Farbe der Blüten

[1]) H. Molisch, Studien über den Milch- und Schleimsaft der Pflanzen, Jena 1910.

[2]) F. Eschbaum, Kristall. Ausscheidungen in Nährböden, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1902, XII, S. 177.

[3]) O. Richter, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1905, XXII, S. 209.

(die Rosafärbung der Hortensien geht bei Zusatz von Eisenchlorid in Blau über). Im Samen und im Holze ist der Eisengehalt gering (selten über 1 %), ebenso in der Rinde; in den Blättern finden sich häufig größere Mengen. In ausgewachsenen Blättern und in älteren Rinden sind meist höhere Werte ermittelt.

Zum Nachweis des Eisens im Gewebe sind nach den kritischen Untersuchungen von Molisch[1]) Tannin, Salizylsäure, Schwefelammon, Rhodankalium[2]) wenig geeignet. Am besten gelingt der Nachweis mit den Blutlaugensalzen. Bei der Herstellung der Präparate müssen eiserne Instrumente nach Möglichkeit vermieden werden. Zum Schneiden benutzt man vorteilhaft Messer mit Klingen aus Silber oder aus harter Aluminiumbronze, doch sollen auch bei Verwendung von sehr sauberen Stahlmessern keine Versuchsfehler unterlaufen. An Stelle der Stahlnadeln lassen sich fein ausgezogene Glasstäbe verwenden. Die nicht zu zarten Präparate werden zunächst auf Eisenoxydverbindungen geprüft und gelangen zu diesem Zwecke auf 1 bis 24 Stunden in eine 2 % wässerige Lösung von gelbem Blutlaugensalz. (Die Dauer der Einwirkung des Ferrocyankaliums richtet sich nach der Dicke der Schnitte.) Darauf werden sie auf dem Objektträger mit 10 % Salzsäure (frei von Eisen!) versetzt. Es tritt bei Gegenwart von Eisenoxyd sofort Bildung von Berlinerblau ein. Die Salzsäure ist, sobald sie das Präparat durchdrungen hat, auszuwaschen, denn bei längerer Einwirkung der Säure kann das aus dem Blutlaugensalz stammende Eisen Bildung von Berlinerblau veranlasen. Ist Eisenoxyd nicht zugegen, so muß noch auf Eisenoxydul geprüft werden, und zwar in gleicher Weise mit 2 % Lösung von rotem Blutlaugensalz (Ferricyankalium). Schließlich ist die Asche zu untersuchen.

Die Annahme, daß sich mit obiger Reaktion auch „maskiertes Eisen“ nachweisen lasse, hat sich nicht bestätigt. Molisch[3]) nahm nämlich in jenen Präparaten maskiertes Eisen an, die erst nach Vorbehandlung mit reinster Kalilauge eine Eisenreaktion gaben. A. Meyer[4]) meinte, daß in jenen Fällen das Eisen aus der benutzten Kalilauge herrühre, doch konnte C. Müller[5]) zeigen, daß Kaliumhydroxyd (in Stangen) stets eisenfrei ist, daß die hergestellten Laugen jedoch aus dem Glase der Aufbewahrungsgefäße Eisen aufnehmen.

[1]) H. Molisch, Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen, Jena 1892.

[2]) Rhodankalium benutzen Weiß und J. Wiesner (Üb. d. direkt. Nachw. d. Eisens in d. Zell. d. Pfl., Sitzber. Wien. Ak., 1860, XL, I. Abt., S. 276).

[3]) H. Molisch, Bemerkungen über den Nachweis von maskiertem Eisen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1893, XI, S. 73.

[4]) A. Meyer, Ref. über Molisch: Die Pflanze in ihrer Beziehung zum Eisen, Flora 1892, LXXVI, Ergzbd., S. 292.

[5]) C. Müller, Kritische Unters. über d. Nachweis maskierten Eisens in der Pflanze und den angeblichen Eisengehalt des Kaliumhydroxyds, Ber. deutsch. bot. Ges., 1893, XI, S. 252.

Macallum[1]) bediente sich beim Nachweis von Eisen im Zentralkörper von Oscillaria Froelichii, Tolypothrix tenuis, Cylindrospermum majus, sowie zum Eisennachweis der Nukleoproteide (s. d.) der gleichen Methode. Das mit Alkohol fixierte Material kommt auf 2—5 Minuten in angesäuerten Alkhol (5 $^0/_0$ bei 35 ^{0} C), wird mit 95 $^0/_0$ Alkohol ausgewaschen und gelangt auf 5 Minuten in eine 1,5 $^0/_0$ Lösung von Ferrocyankalium, die mit 0,5 $^0/_0$ Salzsäure versetzt ist. Anderseits benutzte er eine Mischung von Glyzerin und Ammoniumsulfid.

Die mit 70 $^0/_0$ Alkohol fixierten Präparate werden auf dem Objektträger in frisch bereitetes Schwefelammon gebracht. Nach Quincke soll aber ein älteres Schwefelammon wirksamer sein (Über direkte Eisenreaktionen in tierischen Geweben, Arch. exp. Pathol. u. Pharm., 1896, XXXVII, S. 185). Zur Verhütung des Eintrocknens der Präparate wird etwas Glyzerin zugefügt, dann wird mit dem Deckglas bedeckt. Eisenhaltige Zellbestandteile werden grünlich. Nun wird mit Glyzerinwasser ausgewaschen und ein Gemisch von Salzsäure und Kaliumferricyanid zugesetzt (s. oben). Die grünlich gefärbten Teile werden dadurch blau. Auf diese Weise läßt sich nur das in lockerer Bindung anwesende Eisen nachweisen, nicht aber Hämoglobineisen (E. Meyer) u. a. „Eine eisenreiche Verbindung, welche mit Schwefelammon und Ammoniak keine Eisenreaktion gab, erhielt Abderhalden aus Spinat" (E. Zacharias, Progressus rei bot., 1909, III, S. 127). Nach Marfori (Annal. d. Farmacot., 1898, S. 433) soll die Konzentration des Schwefelammons und auch die Temperatur von Einfluß auf das Gelingen der Reaktion sein. — Zur Unterscheidung von „maskiertem" und „nicht maskiertem" Eisen gebrauchte Macallum eine 5 $^0/_0$ Lösung von Hämatoxylin in destilliertem Wasser. „Nicht maskiertes" Eisen bedingt eine blauschwarze Farbenreaktion. Maskiertes Eisen verändert die bräunlich-gelbe Hämatoxinlösung nicht. Eine Kritik der Methoden von Macallum würde hier zu weit führen, es muß auf Zacharias (a. a. O.) verwiesen werden. Bei Nachprüfungen, die mit großer Sorgfalt ausgeführt wurden, erhielt ich nur unklare Präparate (Vicia faba, Allium), bei Adiantum war die stärkste Reaktion mit Schwefelammon stets in den Chlorophyllkörnern. — Auch die Versuche in Anlehnung an A. Mouneyrat (Bull. commerc. 1906, Nr. 5), das Schwefeleisen mit Ammoniak und Schwefelwasserstoff zu fällen, waren nicht immer befriedigend. Nach Mouneyrat soll sich derart noch 1 μg Eisen nachweisen lassen. Bei dieser Reaktion werden die Schnitte mit Ammoniakwasser (1 : 100, eisenfrei) alkalisch gemacht und danach

[1]) A. B. Macallum, On the cytology of non-nucleated organisms, Trans. Canadian Inst., 1899, VI, S. 439 und: Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1892, IX, S. 337.

1/2 Stunde lang den Dämpfen von Schwefelwasserstoff ausgesetzt. Bei grünen Pflanzenteilen sind die Färbungen nicht immer genügend klar, die Schnitte werden rasch gelb (infolge von Schwefelausscheidungen).

In der Mineralogie werden noch weitere Reaktionen herangezogen, die das Eisen als Kieselfluoreisen, als Eisen-oxyduloxalat oder -sulfid fällen, die aber sämtlich im Gewebe versagen und nicht eindeutige Ergebnisse liefern. Man muß gegenwärtig die Reaktion mit Blutlaugensalz als die einzige brauchbare und einfachste ansehen. Die Methode ist dann wiederholt erprobt worden, so von Saget[1]) und Mitlacher[2]) bei Rumex-Arten. Im Rhizom von Rumex alpinus traf letzterer Eisen im Inhalt der Gefäße und im Phloem an.

Mangan.

Trotzdem Mangan zu den entbehrlichen Stoffen gehört, ist es doch in vielen Pflanzen verbreitet, wie die Befunde der Aschenanalysen zeigen. Im allgemeinen hält sich der Mangangehalt in niederen Grenzen, in Früchten, Samen, Hölzern, Rinden finden sich meist bis 1 % der Asche. Doch kommen höhere Werte vor (Buchen- und Birkenholz 5—15 %). Am meisten Mangan führen die Wasserpflanzen und die Blätter der Landpflanzen (Thea, Strychnos, Sarothamnus scoparius), besonders der Hopfen ist manganbedürftig. Doch schwanken auch hier die Verhältnisse selbst bei sehr nahe verwandten Pflanzen; Digitalis purpurea führt 9,02 % Mangan in der Asche, D. lutea und ambigua sind manganfrei. Manganliebende Pflanzen sind kalkscheu. Werden Eisenbakterien mit Mangan gefüttert, dann schwellen ihre Scheiden stark an. Über die physiologische Bedeutung des Mangans, das häufig Enzyme begleitet und in anorganischer und organischer Bindung auftritt, sind wir nur mangelhaft unterrichtet[3]). Bertrand bezeichnet es als ein katalytisches Düngemittel[4]).

In der reinen Mikrochemie stehen zum Mangannachweis verschiedene Reaktionen in Anwendung. Schon Haushofer[5]) fällte aus Lösungen von Manganoxydulsalzen mit Oxalsäure Manganoxalate, die sich beim Eintrocknen der Flüssigkeiten in Form von sternartig grup-

---

[1]) P. Saget, Étude de botan. et chim. de Rumex crispus, Thèse, Montpellier 1903.

[2]) W. Mitlacher, Über eine Verfälschung von Radix Gentianae mit dem Wurzelstock von Rumex alpinus L., Zeitschr. d. öst. Apoth. Ver. 1909, LIII, Nr. 42.

[3]) Vergl. jedoch: G. Gola, Studi sulla funzione respiratoria nelle piante acquatiche, Ann. di Bot., 1907, V, S. 441 und J. Stoklasa, Die phys. Bedeutung des Mangans und Aluminiums in der pflanzlichen Zelle, Compt. rend., 1910, CLII, S. 1340.

[4]) Spuren von Mangan im Boden fördern das Gedeihen der Pflanzen (G. Bertrand, Vortr. Congr. Angew. Chem., New York 1912).

[5]) K. Haushofer, Mikroskopische Reaktionen, Braunschweig 1885, S. 96.

pierten, farblosen Prismen abscheiden. Sind nur Spuren vorhanden, dann kann man mit Schoorl[1]) die Probe zur Trockne bringen, ein Körnchen Kaliumoxalat zusetzen und durch Anhauchen verflüssigen, wobei man ähnliche Kristallfällungen erhält. Bei dieser Reaktion dürfen aber keine starken anorganischen Säuren zugegen sein, eine schwache Azidität ist förderlich, die Gegenwart von Zink wirkt störend. Ein Zusatz von Kaliumchromat hat sich als zweckmäßig erwiesen. Es scheint ein Doppelsalz von Kaliumchromat mit Mangan zu entstehen (dunkelbraune, doppelbrechende Kristallrosetten). Die Empfindlichkeitsgrenze liegt bei 5 μg (Wagenaar)[2]). Nun hat aber Gössl[3]) gezeigt, daß diese Reaktionen zum Mangannachweis im Pflanzengewebe nicht genügend scharf sind, und empfiehlt Fällung mit Natrium-Ammoniumphosphat bei Gegenwart von Ammoniakdämpfen. Hierbei entstehen nun nicht nur die Tripelphosphate des Mangans, sondern auch die von Eisen, Kobalt, Nickel und Magnesium. Gössl fand aber, daß sich die letzteren sämtlich vom Manganphosphat durch $^n/_{10}$ Kaliumpermanganat unterscheiden lassen. Nur die Manganfällungen färben sich hierbei braun. Zudem ist diese Reaktion am empfindlichsten. Noch 0,018 μg Mangan können nachgewiesen werden. Zur Reaktion wird eine verdünnte (0,5 $^0/_0$) Lösung von Natrium-Ammoniumphosphat benutzt. Liegt das Mangan im Gewebe in schwer löslicher Verbindung vor, so werden die Schnitte zunächst in 0,1 $^0/_0$ Salzsäure gelegt, dann wird Natrium-Ammoniumphosphat zugesetzt und das Präparat über Nacht in Ammoniakdampf belassen.

Zur Manganuntersuchung von Pflanzenaschen benutzt man allgemein die Soda-Salpeterschmelze am Platindraht, die auch bei Gegenwart von Zink eintritt und noch 0,5 μg Mangan anzeigt. Die Oxydationsschmelze zeigt grüne Färbung, die bei Säurezusatz dunkelrot wird (Permanganat). Grüne bis blaugrüne Pflanzenaschen sind manganhaltig, das Manganat wird unter Mitwirkung der Alkalien der Aschen gebildet. Gewöhnlich liegt Mangan in der Asche als Phosphat vor. Wird die Asche mit Wasser und mit phosphorsäurehaltiger Salpetersäure ausgezogen, dann zeigt ein violetter Rückstand Mangan an.

---

[1]) N. Schoorl, Beiträge zur mikroskopischen Analyse; vergl. Emich, Lehrbuch der Mikrochemie, S. 102.

[2]) A. Wagenaar, Mikrochemische Reaktion auf Mangan, Pharm. Weekbl., 1912, XLIX, Nr. 1.

[3]) J. Gössl, Über das Vorkommen des Mangans in der Pflanze und über seinen Einfluß auf Schimmelpilze, Beih. bot. Centralbl., 1904, XVIII 1, S. 119.

Aluminium.

Aluminium ist für die Pflanzen entbehrlich. Da es sich überall im Boden findet, so treffen wir es in vielen Pflanzen an. Die aufgenommenen Quantitäten sind nicht groß, da die Aluminiumverbindungen des Bodens im allgemeinen schwer löslich sind. Das aufgenommene Aluminium wird überwiegend in der Wurzel zurückgehalten (Rothert). Zu „Aluminiumpflanzen" zählen die meisten Lycopodien (27—52 %), einige Baumfarne, Flechten (Cetraria islandica, 4 %), Pilze und Moose. Aluminiumbedürftig ist Humulus (Stoklasa). Im allgemeinen sind 0,3—0,5 % der Reinasche bereits hohe Werte. Eine Ausnahme bildet Orites excelsa R. Br. (36 bis fast 80 % Tonerde in der Asche); hier soll im Holz basisch bernsteinsaures Aluminium abgelagert sein (Smith). Über den Einfluß der Aluminiumverbindungen wissen wir wenig[1]). Bei Bakterien hemmen sie das Wachstum (Aufrecht). Düngung mit Kalialaun oder Aluminiumsulfat fördert die Bildung blauer Blüten (durch vermehrte Bildung blauer Anthocyane aus roten, Molisch).

In Symplocosarten hat Radlkofer[2]) Tonerdekörper aufgefunden, so in den Palisaden und im Rindenparenchym von Symplocos lanceolata (Mart.) A. DC., dem Alaunbaum von Rumphius, ferner in S. ferruginea Roxb., S. racemosa Roxb., S. fasciculata Zoll. Sie lösen sich beim Glühen mit Schwefelsäure, auch in frisch bereiteter Javellescher Lauge und färben sich intensiv rot mit Alizarin und Brasilin (in 70 % Alkohol), selbst nach Vorbehandlung der Präparate mit 0,5 % Ammoniaklösung. Über ihre Natur gibt aber erst die Aschenanalyse Aufschluß. Die Blattasche enthält fast 50 % Tonerde. Eingehende mikrochemische Arbeiten über den Aluminiumnachweis in den Zellen selbst liegen nicht vor und man muß Rothert[3]) beipflichten, daß die Frage der Verbreitung dieses Elementes in der Pflanze noch nicht geklärt ist.

Zum Nachweis kleiner Mengen von Alaun in Mehl und Brot benutzte Blyth[4]) Campechuextrakt. Er ließ in den kalt bereiteten wässerigen Auszügen dieser Genußmittel einen Gelatinestreifen quellen und färbte diesen mit Campecheholz, Blaufärbung zeigt Alaun an.

---

[1]) M. Fluri, Der Einfl. von Aluminium a. d. Protoplasma, Flora, 1909, XCIX, S. 81.

[2]) L. Radlkofer, Über Tonerdekörper in den Pflanzenzellen, Ber. Deutsch. Bot. Ges., 1904, XXII, S. 216.

[3]) W. Rothert, D. Verhalten d. Pflanz. gegenüber d. Aluminium, Bot. Ztg., 1906, LXII, S. 43.

[4]) W. Blyth, The Analyst, 1880, VII, S. 16.

Lenz[1]) gebrauchte in neuerer Zeit ebenfalls diese Methode, indem er Hämatoxylinlösung (1% Lösung in Alkokol von 50 Gewichtsprozenten) anwandte. Zusatz von Hämatoxylin zu einer alaunhaltigen Flüssigkeit färbt diese intensiv blau, „während von Tonerde freie Flüssigkeiten nur eine nach Violett spielende Rotfärbung zeigen". Diese Reaktion, die zum Nachweis von Aluminium in der Asche brauchbar ist, wird sich wahrscheinlich auch für Gewebe benutzen lassen; sie ist empfindlicher als die Reaktion von Streng mit Kaliumbisulfat. Mit Kaliumbisulfat scheiden sich flache Oktaeder von Kaliumalaun ab, die ziemlich leicht löslich und oft anisotrop sind. H. Behrens hat 1881 Caesiumchlorid als Reagens eingeführt. Zur Alaunlösung, die etwas freie Schwefelsäure enthalten soll, wird ein Körnchen Caesiumchlorid gebracht. Es gelangen farblose, tafelförmige Oktaeder von schwer löslichem Caesiumalaun zur Abscheidung. Nach Schoorl[2]) eignet sich am besten Cäsiumchlorid, welches durch Spuren von Cäsiumalaun (als Impfsubstanz, verunreinigt ist (1,0 Caesiumalaun in 1000000,0 Caesiumchlorid). Die Anwendung im Gewebe müßte erst erprobt werden[3]).

Kupfer.

Da Kupferverbindungen im Boden häufig vorkommen, so sind die zahlreichen Befunde über die Anwesenheit von Kupfer in den Pflanzen erklärlich (Capsicum, Taraxacum, Vicia faba, Zea mays, Quercus, Odyendea gabunensis, Strychnos nux vomica u. a., s. auch Czapek, Biochemie, II, S. 856). Kupfer tritt besonders in Samen und Wurzeln, aber auch in den Blättern, im Stengel und Stamm auf. In Pflanzen, die auf stark kupferhaltigem Boden wachsen, soll sich Kupfer in metallischer Form in den Gefäßen und Holzelementen vorfinden (Mac Dougal). Das bisher Ermittelte über Lokalisation fußt auf makrochemischen Arbeiten. Über die Art der Bindung des Kupfers in der Zelle sind wir nicht unterrichtet (Lehmann hat Kupfereiweißverbindungen angenommen).

Über den Nachweis in Geweben oder mit Schnitten liegen keine Angaben vor. Zum Studium wird es sich empfehlen, Pflanzen auf stark kupferhaltigen Böden zu ziehen. Über die Gegenwart von Kupfer wird man sich zuvor durch einige makrochemische Prüfungen unterrichten (Flammenreaktion, Lötrohrversuche, Aloinreaktion[4]) u. a.). Endo-

[1]) W. Lenz, Nachweis von Alaun in Mehl und Brot, Apoth. Ztg., 1911, XXVI, S. 687.

[2]) N. Schoorl, Chem. Weekbl., 1911, VIII, S. 268; Ztschr. f. analyt. Chem., 1911, S. 266.

[3]) Das gegenwärtig im Handel befindliche Caesiumchlorid ist frei von Tonerde, das Reagens muß erst geimpft werden (W. Lenz, Briefl. Mitt.).

[4]) Empfindlichkeitsgrenze 1 : 100000 (A. Beitter, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1900, X, S. 411).

spermschnitte von Strychnos nux vomica (frisches Material aus dem botanischen Garten in Saigon) gaben mit Ammoniak Blaufärbung. Mehrere große Schnitte kamen in einen ausgehöhlten Objektträger in einen großen Tropfen Ammoniak, das Deckglas wurde luftdicht verschlossen. Zunächst entstanden die Alkaloidfällungen und nach 5 bis 8 Stunden ließ sich beim Halten der Objektträger über eine weiße Unterlage eine Blaufärbung feststellen. An Handelsmaterial gelang die Reaktion nicht und bei den geprüften 9 frischen Samen trat nur 4 mal eine kräftige Färbung ein. Für sich allein ist die Reaktion nicht beweisend, auch wenn sie, wie im vorliegenden Falle, mit Ammoniumkarbonat ebenfalls eintritt. Ob der Nachweis von Kupfer nach Bradley[1]) mittels Blauholzhämatoxylin (Blaufärbung), der noch bei 1 : 1000000000 gelingen soll, auch bei Geweben erbracht werden kann, muß erst erprobt werden, würde aber gleichfalls die nötige Kritik erfordern (Aluminium, S. 128). Besser wäre, weil kristallinische Produkte gebend, Caesiumchlorid[2]). Dieses gibt mit Kupferverbindungen in salzsaurer Lösung gelbe oder rote, nadelförmige oder prismatische Kristalle. Die Reaktion gelingt noch mit 0,1 μg. (Weitere Reaktionen bei Behrens, Anleit. S. 75—78).

II. Organischer Teil.

1. Methanderivate.

Dulcit, Mannit, Sorbit.

Die sechswertigen Alkohole Mannit, Dulcit, Sorbit finden sich häufig in Pflanzen. Mannit läßt sich leicht aus der Handelsmanna herstellen. Er scheidet sich aus der mit siedendem Alkohol bereiteten Mannalösung beim Erkalten kristallinisch aus. Aus Alkohol fällt er in feinen seidenglänzenden Nadeln, aus Wasser in farblosen Prismen. Mannit löst sich leicht in heißem Wasser und Alkohol, schwer in kaltem Wasser; unter Deckglas kann er mit kaltem Alkohol umkristallisiert werden (Fig. 34). Fehlingsche Lösung wird bei kurzem Kochen nicht reduziert. Mannit kommt zu 30—60 % in der Handelsmanna vor (hier ist die abnorme Menge eine Folge der Verwundung von Fraxinus ornus), ferner in Laminaria flexicaulis, L. digitata, L. saccharina (5—12 %), in Pilzen (Mutterkorn,

[1]) H. C. Bradley, Eine empfindliche Kupferreaktion und eine mikrochemische Probe auf Zink, Amer. Journ. of Sci., Ref. Chem. Centralbl., 1906, II, S. 1873.

[2]) P. A. Meerburg u. H. Filippo, Chem. Weekbl., 1905, II, S. 461, Südd. Ap. Ztg., 1905, XLV, S. 835.

Lactarius-, Agaricus-, Elaphomyces-Arten), im Spargel, im ausgeschwitzten Safte mancher Fichten, Linden und Obstbäume, in Blättern (Syringa vulgaris, Ligustrum vulgare, Jasmin-Arten, Olea europaea, Linaria, Apium graveolens), in Rinden (Canella alba, Phillyrea latifolia, Fraxinus excelsior, Wahrburgia Stuhlmannia, Platanus orientalis, Genipa brasiliensis, Basanacantha spinosa) in Wurzeln (Scorzonera hispanica, Daucus carota, Triticum repens, Punica granatum, Apium graveolens, Aconitum napellus, Meum athamanticum, Polypodium vulgare, Glycyrrhyza glabra), in Früchten (Coffea arabica, Opuntia vulgaris, Prunus laurocerasus, Laurus persea). Dulcit scheidet sich aus der wässerigen Lösung der Madagaskar-Manna in monoklinen prismatischen Kristallen ab, die in kaltem Wasser schwerer als Mannit löslich sind. Dulcit findet sich in Melampyrum pratense, M. nemorosum, Scrophularia nodosa, Evonymus europaea, E. atropurpurea, E. japonica, hauptsächlich in Scrophulariaceen und Celastraceen. Bei Scrophulariaceen hat Monteverde Vorkommen oder Fehlen von Mannit und Dulcit als Gruppen-

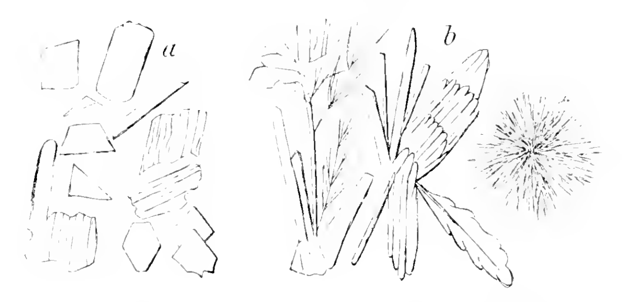


Fig. 34. *a*) Splitter reiner Manna (Droge, in Tränen), in Wasser liegend, beim Beginn der Lösung; *b*) Mannitkristalle mit Alkohol aus der Droge erhalten. Die gleichen Kristallformen erhält man bei der direkten Sublimation der Droge (Tunmann).

merkmal benutzt. Der isomere Sorbit ist nur in Früchten der Pomaceen und Prunaceen gefunden worden, wird aus den Früchten von Sorbus aucuparia dargestellt und bildet kleine farblose Kristalle, die sich leicht in Wasser, schwer in Alkohol lösen.

In physiologischer Hinsicht vertreten die Zuckeralkohole die Glykose. Stärkebildung aus Mannit und Dulcit hat 1885 A. Meyer und aus Sorbit in neuerer Zeit Treboux nachgewiesen. Der Mannit in den Früchten von Olea europaea soll nach Gerber und de Luca der Ölbildung dienen. Hartwich und Uhlmann konnten nur Spuren von Mannit nachweisen und geben Glykose als Ausgangsmaterial der Ölbildung bei Olea an.

Zum Nachweis der Zuckeralkohole ist es empfehlenswert, lebende Pflanzen benutzen zu können. Geeignete Objekte zum Nachweis von Mannit sind Blätter von Olea europaea und Fraxinus ornus, für den Nachweis von Dulcit junge Triebe von Evonymus-Arten. Sorbit läßt sich in den roten (nicht grünen) Früchten von Sorbus aucuparia nach-

weisen. Zum Nachweis von Dulcit brachte Borodin[1]) die Schnitte auf dem Objektträger in einen oder doch nur wenige Tropfen Alkohol, legte das Deckglas auf und ließ die Objekte langsam eintrocknen. Dulcit scheidet sich in Form von unregelmäßigen tafelförmigen oder prismatischen Kristallen aus. In gleicher Weise wies Monteverde[2]) Mannit nach, der in feinen, glänzenden Nadeln auskristallisiert. Der Sorbitnachweis gelang mir derart nicht. Nun scheiden sich aus Alkohol nicht nur die Zuckeralkohole aus, sondern auch Kristalle von Salpeter, die mit Diphenylamin-Schwefelsäure leicht zu erkennen sind, ferner andere anorganische Salze, Asparagin (s. d.) u. a. Somit ist die Ausführung der Borodinschen Probe unbedingt erforderlich. Mannitkristalle wachsen und vermehren sich bei Zusatz einer völlig gesättigten, wässerigen Lösung von Mannit, während Dulcitkristalle langsam

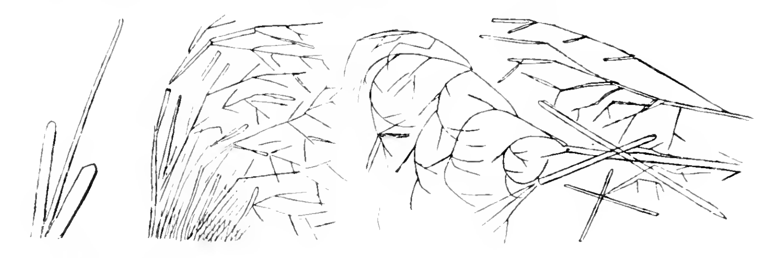


Fig. 35. Mannitkristalle aus Fraxinus ornus, aus Schnitten mit Alkohol im Hängetropfen erhalten (Tunmann).

gelöst werden. Letztere wachsen andererseits bei Zusatz ihrer Lösungen, während die übrigen wasserlöslichen Ausscheidungen gelöst werden.

Sind nur geringe Mengen zugegen oder arbeitet man mit 1 bis 2 Schnitten, dann sorge man für möglichst langsame Verdunstung, indem man mehr Alkohol anwendet, das Deckglas nach einiger Zeit abhebt und den Objektträger umlegt, so daß der Rest des Alkohols (als Hängetropfen) langsam verdunstet. Überwiegend entstehen die Kristalle erst nach 12—24 Stunden; sie finden sich fast stets am Deckglasrande zu baum- und strauchartigen Gruppen vereint (Fig. 35). Bessere Erfolge wie mit kaltem Alkohol habe ich bei verschiedenen Objekten erhalten (Olea europaea, Fraxinus ornus)[3]), wenn die Schnitte

[1]) Borodin, Über die mikrochemische Nachweisung und die Verbreitung des Dulcits im Pflanzenreiche, Ref. Bot. Zentralbl., 1890, XLIII, S. 175.

[2]) N. A. Monteverde, Über die Verbreitung des Mannits und Dulcits, Ann. agr., 1893, XIX, S. 444, Sep.

[3]) Im Blatte von Fraxinus ornus war im Monat Juli stets mehr Mannit zugegen als im Blatte von Olea europaea.

in Alkohol aufgekocht wurden. Man kann auch einige Schnitte auf dem Objektträger in einigen Tropfen Wasser aufkochen, bis nur eine Spur Flüssigkeit zurückbleibt, dann das Deckglas auflegen und dem noch heißen Objekte Alkohol zufügen. Auch hierbei scheiden sich nach dem Verdunsten die Kristalle am Deckglasrande ab. Bei Behandlung mit heißem Alkohol ist nach dem Eindunsten die Kristallschicht am Deckglasrande oft makroskopisch sichtbar (Rindenparenchym von Evonymus europaea). Beim Versagen der Reaktion mit Schnitten muß ein größeres Pflanzenstück fein zerschnitten und im Reagenzglase mit Alkohol ausgekocht werden. Der alkoholische Auszug wird im Uhrglase eingedunstet und sein Rückstand untersucht.

Beim Mannitnachweis leistet die Sublimation brauchbare Dienste[1]). Bei der Handelsmanna erhält man ein Sublimat aus reinen Mannitkristallen (Fig. 34b). Bei pflanzlichen Objekten zieht man einige Schnitte auf dem Objektträger mit Alkohol aus, läßt den Auszug, nachdem die Schnitte beiseite geschoben wurden, eindunsten und sublimiert den Rückstand. Das Sublimat besteht dann fast ausschließlich aus Mannit. Der Sorbitnachweis ist am schwierigsten (Sorbit gibt kein brauchbares Sublimat). Er gelingt nur mit heißem Alkohol oder Wasser einigermaßen; es ist ratsam, den Objektträger eine Woche in den Exsikkator zu legen. Zum Aufsuchen der Sorbitausscheidungen ist polarisiertes Licht heranzuziehen. Vielfach findet man den Sorbit in sphärokristallinischen Gebilden, die bei gekreuzten Nikols ein dunkles Kreuz zeigen und später moosartige Figuren bilden. Übrigens kristallisiert reiner Sorbit ebenfalls am Objektträger nur schwierig. Zuweilen (nicht immer) gelingt der Nachweis mit Benzaldehyd. Nicht zu dünne Schnitte von Sorbus (frische rote Früchte) werden mit verdünnter Schwefelsäure (1 : 10) befeuchtet und in Benzaldehyd eingelegt. — Der Nachweis der Zuckeralkohole in der Zelle gelingt nur selten.

Formaldehyd.

Nach der Hypothese von Bayer sollen die Pflanzen bei der Assimilation die Kohlensäure mit Hilfe des Chlorophylls zu Formaldehyd reduzieren; dieser wird dann weiter zu Kohlehydraten kondensiert. Der Nachweis von Formaldehyd ist daher von großer Bedeutung. Reinke und Braumüller beschäftigten sich mit dieser Frage schon 1899, dann nahm Curtius das Studium auf und hat in letzter Zeit mit Franzen[2]) aus Blättern einen α, β-Hexylenaldehyd und vor

[1]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie und Mikrosublimation einiger Methanderivate, Apoth. Ztg., 1912, XXVII, S. 971.

[2]) J. Reinke u. Braumüller, Unters. über den Einfluß des Lichtes auf den Gehalt grüner Blätter an Aldehyd, Ber. deutsch. bot. Ges., 1899, XVII, S. 7.

kurzem aus Carpinus betulus Formaldehyd gewonnen (1 kg = 0,8613 mg). Nach Nizza[1] soll ferner freier Formaldehyd, der kein Produkt der Assimilation ist, im Holze vorkommen. M. Kleinstück hat ihn im Kambialsaft der Koniferen gefunden (Ber. deutsch. chem. Ges., 1912, XLV, S. 2902).

Eine empfindliche Reaktion verdanken wir Grafe[2]; sie beruht auf Bildung grüner Kondensationsprodukte des Formaldehyds und Diphenylamins. Benutzt wird eine 1% Lösung von Diphenylamin in konzentrierter Schwefelsäure. Die Präparate der betreffenden Blätter kommen in das Reagens, der Objektträger wird mehrere Male durch eine Flamme gezogen, die entstehende Grünfärbung zeichnet sich durch Haltbarkeit aus (andere Aldehyde geben bald rot werdende Färbungen, Benzaldehyd, Vanillin, Propion- und Isobutylaldehyd). Kimpflin[3]) benutzt eine konzentrierte Natriumbisulfitlösung, die mit Methyl-p-amino-m-Kresol im Überschuß versetzt ist. Das Reagens wird in ein langes Rohr gebracht, dessen Ende umgebogen und in eine feine kapillare Spitze ausgezogen ist. Die Spitze wird in das Gewebe eingeführt (Agave mexicana). Die Einwirkung währt im Sonnenlichte einige Stunden. Dann wird der imprägnierte Teil abgeschnitten und in absoluten Alkohol gelegt. Der rote Niederschlag in vielen Parenchymzellen zeigt Formaldehyd an.

Meist wurde der Nachweis von Formaldehyd auf makrochemischem Wege zu führen versucht. Pollacci[4]) benutzte Codein und Schwefelsäure, Schryver[5]) Phenylhydrazinchlorid, Kaliumchlorid und Salzsäure. Letzteres Reagens ist jedenfalls dem von Rimini[6]) nachgebildet, das aus Phenylhydrazinchlorid, Eisenchlorid und Salzsäure besteht, aber nach Arnold und Mentzel[7]) auch mit Azetaldehyd und nach Meth[8]) mit Akrolein reagiert (Rotfärbung). Phenylhydrazinchlorid, Nitroprussidnatrium und Kalilauge ist ebenso empfindlich und gibt eine

---

Th. Curtius u. H. Franzen, Aldehyd aus grünen Pflanzenteilen, Sitzber. Heidelberger Ak., 1910, XIII und: Vorkommen von Formaldehyd in den Pflanzen, Ber. chem. Ges., 1912, XLV, S. 1715.

[1]) S. Nizza, Il problema dell'aldeide formioa nelle piante, Malp., 1906, XX, S. 395.

[2]) V. Grafe, Über ein neues spezifisches Formaldehydreagens, Österr. botan. Ztschr., 1906, LVI, S. 289.

[3]) P. Kimpflin, Über die Gegenwart von Methanal (Formaldehyd) in grünen Pflanzen, Compt. rend., 1907, CXLV, S. 148.

[4]) G. Pollacci, Atti R. Ist. Bot. dell'Univ. di Pavia, 1899, VI, S. 45.

[5]) S. B. Schryver, Chem. Ztg., 1910, XXXIV, S. 125.

[6]) Rimini, Ann. d. Farmacol., 1898, S. 97.

[7]) Arnold u. Mentzel, Ztschr. f. Nahr. u. Gen., 1902, V, S. 353.

[8]) Meth, Chem. Ztg., 1906, XXX, S. 666.

blaue Farbenreaktion. Möglicherweise sind diese Reaktionen mikrochemisch verwertbar.

Ameisensäure.

Ameisensäure (Monocarbonsäure), zuerst von Aschoff in Pinus abies (Holz und Nadeln) aufgefunden, tritt in geringer Menge (frei oder gebunden) in sehr vielen Pflanzen auf, besonders in Früchten (Ceratonia siliqua, Juniperus communis, Tamarindus indica, Sapindus saponaria), ferner in Sempervivum tectorum, auch in Kryptogamen (Plasmodien, Secale cornutum, Vaucheria) und ganz allgemein in Wurzelspitzen (Goebel, Czapek, Kunze). Nach den makrochemischen Befunden von Stoklasa und Ernest[1]) fehlt aber Ameisensäure im Wurzelsekret. Bergmann[2]) destillierte getrocknete feinzerriebene Pflanzenteile mit etwas Weinsäure im strömenden Wasserdampf und weist Ameisensäure im Destillat makrochemisch nach.

Innerhalb der Zellen wurde Ameisensäure in Wurzeln nachgewiesen, indem Wurzelstücke in eine konzentrierte wässerige Sublimatlösung gebracht wurden, die mit Wasser auf das fünf- oder zehnfache verdünnt war. Dann wird im Wasserbade 1 bis 2 Stunden erhitzt, sowie in Wasser und nachher in salzsäurehaltigem Wasser abgespült und nun das Material auf einige Minuten in eine schwach erwärmte 1 % Kalilauge getaucht. Ameisensäurehaltige Teile zeigen sich durch Schwärzung an. In den Präparaten findet man die Schwärzung im Protoplasma (nicht im Zellsaft und Zellkern). Metallinstrumente dürfen bei der Reaktion nicht benutzt werden. Calomelbildung wurde zum Nachweis der Ameisensäure im Wurzelsekret herangezogen. Die Objekte gelangen in Sublimatlösung und werden bis auf 80° erhitzt. Die Ameisensäure reduziert Quecksilberchlorid zu Quecksilberchlorür, welches sich in sehr kleinen, in Salzsäure unlöslichen Würfeln abscheidet (Czapek[3]), Goebel[4])). Die Reaktion kann allerdings auch bei Gegenwart anderer reduzierender Stoffe eintreten. Deshalb brachte Kunze[5]) die Säure als Bleisalz nach Behrens (Mikrochem. Reaktionen, IV) zur Abscheidung. Die Kristalle des Bleiformiat sollen gut kristallographisch bestimmbar sein. Die angeführten Reaktionen müßten jedenfalls noch eingehender studiert werden, da

---

[1]) J. Stoklasa u. A. Ernest, Beiträge zur Lösung der Frage der chemischen Natur des Wurzelsekretes, Jahrb. f. wiss. Bot., 1909, XLVI, S. 55.

[2]) E. Bergmann, Nachweis der Ameisensäure, Bot. Ztg., 1882, XL, S. 731.

[3]) F. Czapek, Zur Lehre von den Wurzelausscheidungen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1896, XXIX, S. 321.

[4]) K. v. Goebel, Pflanzenbiologische Schilderungen II, Marburg 1891, S. 211.

[5]) G. Kunze, Über Säureausscheidung bei Wurzeln und Pilzhyphen und ihre Bedeutung, Jahrb. f. wiss. Bot., 1906, XLI, S. 360.

die Gegenwart von Ameisensäure im Wurzelsekret bestritten worden ist (s. oben).

Zu versuchen wären bei pflanzlichen Objekten noch folgende Reaktionen: Eine Lösung von Ceronitrat, die bei Gegenwart von freier Ameisensäure einen Zusatz von Magnesiumazetat erhält. Beim Eindunsten entstehen große, meist nicht gut ausgebildete, aber recht charakteristische Pentagondodekaeder von Ceriumformiat. Außerdem empfiehlt Haushofer[1]) bei nicht zu verdünnten Lösungen Silbernitrat (Bildung von Silberformiat, flimmernde, an den Enden ausgefranzte Kristalllamellen). Die Formiate geben (ebenso wie die Azetate) mit Eisenchlorid eine intensiv rote Farbenreaktion.

Oxalsäure.

Die Oxalsäure (eine Dicarbonsäure) wurde 1776 von Scheele durch Oxydation von Zucker mit Salpetersäure dargestellt und bald darauf von ihm aus dem Rheumrhizom gewonnen. Sie bildet sich allenthalben im Stoffwechselprozeß aus Zerfalls- und Oxydationsprodukten, nach Euler bei der Veratmung von Kohlehydraten. In freiem Zustande tritt sie sehr selten auf und wurde nur in Boletus sulfureus, B. ignarius (Tripier), Cicer arietinum (Trichome der Kichererbse, Dulong) und Juglans regia (männliche Kätzchen, Rochleder) angegeben. In größerer Menge wirkt sie auf die Pflanzen giftig (Gramineen können größere Quantitäten ohne Schaden vertragen, Bruch, Hartleb).

Der Nachweis freier Oxalsäure kann auf mikrochemischem Wege allein kaum mit Sicherheit geführt werden, zumal es sich in allen Fällen nur um Spuren handeln wird. Überdies wird die freie Säure beim Absterben der Zellen und beim Konservieren der Pflanzen mit den stets anwesenden Alkalien sofort Salze bilden. Reine Oxalsäure ist leicht löslich in Wasser, verdünnten Säuren und Glyzerin, löst sich aber nur schwer in Äther. Sie bildet langgestreckte monokline Prismen und Kombinationen (Haushofer, Mikr. Reakt., S. 82, Fig. 62) und sublimiert bei sehr vorsichtigem Erhitzen leicht (Behrens) in weißen Nadeln. Es erscheint aber fraglich, ob die Sublimation bei Schnitten und Pflanzenpulvern praktisch brauchbare Erfolge liefern wird, da Wasser und andere Substanzen des Pflanzenmaterials, ebenso rasches Erhitzen, zur Zersetzung führen.

Fast stets tritt die Oxalsäure in Form von Salzen auf, und zwar in kristallinischer Form (Kalziumsalz, Magnesiumsalz) oder in Form von im Zellsaft gelöster Salze (Kaliumsalz).

Die Oxalatkristalle kommen in den meisten Familien vor (Ausnahmen nach Kohl: Moose, Cyperaceen, Najadaceen, Lemnaceen, Orobanchaceen, Rhinanthaceen,

[1]) K. Hauskofer, Mikr. Reaktionen, S. 68.

Lentibulariaceen), sowie in allen Teilen der Pflanzen. Sie werden als Exkrete betrachtet. Ein Wiederauflösen der Kristalle (von Wehmer 1889 bezweifelt) findet nur selten und bei bestimmten Verhältnissen statt[1]). Die Oxalate werden als Schutzwaffen gegen Tiere betrachtet (infolge ihrer peripheren Lagerung und ihrer giftigen Wirkung, der Käfer Gastroidea viridula frißt mit Vorliebe oxalsäurehaltige Blätter, Verschaffelt, s. Senfölglykoside). Bei Raphiden ist die Schutzwirkung (Stahl), die allerdings von Lewin bezweifelt wird, eine mechanische. Dafür spricht auch der anatomische Befund (Haberlandt). Reichliches Vorkommen von Oxalaten ist auf das Aussehen von Pflanzen und Drogen zuweilen von Einfluß. Die Graufärbung von Cort. Cascarillae rührt von Oxalaten her, ebenso die graue Zeichnung der Querschnitte mancher Drogen (Cort. Frangulae, Rhiz. Gelsemii) und das Glitzern im Lichte (Iris, Guajacum, China, Quillaja). Der Gesamtgehalt an Oxalsäure schwankt in weiten Grenzen; meist beträgt er nur wenige Prozente (Oxalis acetosella 1.1%), doch auch 7,3% (Rheum), 20,7% (Guajacum) und steigt bis zu 80% (Cacteen). In mehrjährigen Koniferennadeln ist der Gehalt höher als in einjährigen.

Ganz überwiegend erscheint die Oxalsäure im Gewebe als **Kalziumoxalat.** Die Kalziumoxalatkristalle (Kalkoxalate) sind entweder der Membran eingelagert (Solms-Laubach, Pfitzer), oder sie befinden sich, wie in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle, im Zellinhalte. Letztere entstehen im Plasma, nach Wakker in den Vakuolen des Plasma, jedenfalls innerhalb des Plasmaschlauches. Sie umgeben sich später mit einer Hüllhaut, wie die Drusen Rosanoffs. Die Hülle kann durch Balken mit der Zellwand in Verbindung treten (Kerria, Tilia, Ricinus). Bei Studien über die Bildung der Haut (lebendes Material) muß die Lösung der Kristallsubstanz durch stark verdünnte Salzsäure sehr vorsichtig bewirkt werden, da sonst die noch jugendlichen Gebilde leicht fortgerissen werden. Bei den Aurantiaceen werden die monoklinen Kristalle von der Zellwand gewissermaßen eingefangen und einseitig umwachsen (Oxalattaschen Pfitzers). In anderen Fällen, vorzüglich bei Kristallkammerfasern und bei analogen Bildungen, wächst die Membran auf allen Seiten gleichmäßig bis an den im Zentrum der Zelle liegenden Kristall heran, so daß nach dem Lösen des oxalsauren Kalkes das Lumen den Umriß des Kristalles zeigt. Die umhüllende Substanz pflegt zuweilen in bestimmten Lamellen zu verholzen und zu verkorken (Fig. 36). Bei den Raphidenbündeln soll jede einzelne Raphide mit einer Hüllhaut umgeben sein (Wittlin). Es ist bekannt, daß die Oxalatkristalle infolge ihrer Ausbildung und ihres

[1]) Eine Auflösung der Oxalate wurde beobachtet von G. Kraus und seinen Schülern (Rosaceen), Frank (Orchis), Tschirch (Begonia), Tunmann (Grindelia); bei der Gummibildung (Amygdalaceen, Mikosch, Bromeliaceen, Boresch) u. a.; eine Zusammenstellung derartiger Fälle bei: Br. Massopust, Lotos, 1906, Nr. 7 u. 8.

Auftretens ein sehr wichtiges anatomisches Hilfsmittel bilden. Doch selbst zur makrochemischen Differentialdiagnose ist der oxalsaure Kalk herangezogen worden[1]).

Kalziumoxalatkristalle finden sich als Einschlüsse der Aleuronkörner (s. d.) und der Ölplastiden (s. d.).

In der Zelle treten die Kristalle entweder hinter den übrigen Zellbestandteilen zurück oder sie bilden den hauptsächlichsten Zellbestandteil. In letzteren Fällen spricht man von Oxalatzellen oder Oxalatschläuchen[2]).

Kalziumoxalat ist dimorph. Die in der Pflanze vorkommenden Kristalle gehören teils dem tetragonalen (quadratischen) System (mit 6 Mol. Kristallwasser), teils dem monosymmetrischen (monoklinen)

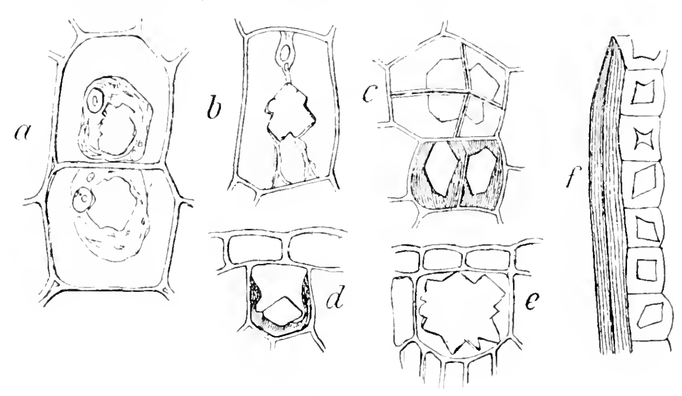


Fig. 36. Hüllen der Oxalatkristalle nach dem Lösen der Kristallsubstanz. Ricinus communis, *a*) jugendliche, *b*) ältere Markzelle, *c*) Ononis spinosa (Wurzel), *d*) Citrus (Blatt, Kristalltasche), *e*) Juglans regia (Blatt), *f*) Rhamnus frangula (Rinde) (Tunmann).

System an (mit 2 Mol. Kristallwasser). Im polarisierten Lichte leuchten tetragonale Kristalle schwach, monokline stark in bunten Farben. Die monoklinen Formen entstehen vielleicht aus freier Oxalsäure und einem unlöslichen Kalksalze[3]).

---

[1]) J. Hendriek, Der Gehalt der Zimt- und Cassiarinde an Kalziumoxalat, Analyst, 1907, XXXII, S. 14. Cassia-Rinde hat nur bis 1,34 % Oxalat, Zimtrinde stets mehr und bis 6 %.

[2]) Über die Verbreitung der Oxalatkristalle in den Pflanzen vergl.: F. G. Kohl, Anatomisch-physiologische Untersuchungen der Kalksalze und Kieselsäure in der Pflanze, Marburg 1889, H. Solereder, Anatomie der Dikotyledonen, Ergzbd., Stuttgart 1908, S. 347, und F. Netolitzky, Blattanatomie, 1905, 1908, 1911.

[3]) C. Wehmer, Die Bildung freier Oxalsäure durch Aspergillus niger, Ber. deutsch. bot. Ges., 1906, XXIV, S. 383.

Wir sehen von einer genauen kristallographischen Bestimmung der Oxalate ab und unterscheiden nachstehende Formen:

Einzelkristalle (Fig. 37) gehören verschiedenen Kristallsystemen an, treten häufig in Zwillingsformen auf. Für die großen Einzelkristalle im Mesophyll von Agave mexicana ist ein Gewicht von 0,00055 mg berechnet (Andrews). Sehr große Einzelkristalle findet man in Irisarten (Rhizom), sehr kleine, nur im polarisiertem Lichte sicher zu erkennende, in vielen Drüsenzellen.

Drusen sind rundliche Kristallgruppen mit zentralem Stützpunkt, meist von morgensternförmiger Gestalt. An ihrem Aufbau beteiligen sich tetragonale und monokline Kristalle. Sehr große Drusen sind im Rhizom der Rheumarten und in den Blättern von Juglans regia, sehr kleine oft in den sezernierenden Zellen der Drüsen (Grindelia). „Drusenartige Gebilde" fand F. Mayer[1]) im Mesophyll der Pogostemoneen; diese kommen dadurch zustande, daß zahlreiche Kristallnädelchen durch Fettmassen zusammengehalten werden und derart Drusen vortäuschen.

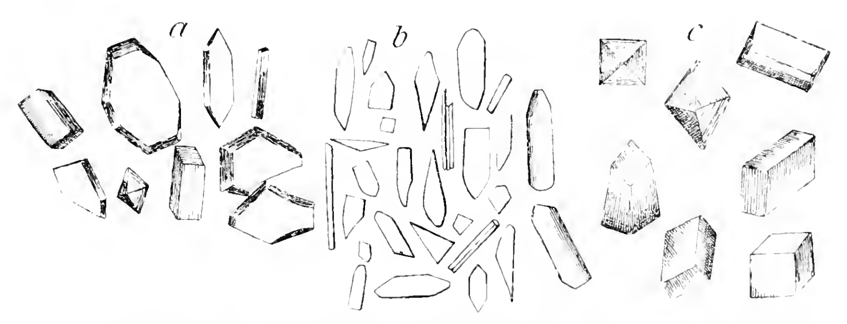


Fig. 37. Einzelkristalle von Kalziumoxalat. *a)* Arctostaphylos uva ursi (Blatt), *b)* Krameria triandria (Wurzel, stark vergrößert), *c)* Jatrorrhiza palmata (Wurzel) (Tunmann).

In den Drusen ist mehr oder weniger ein kleiner Einschluß im Zentrum sichtbar, den Sanio als proteinhaltig ansprach. Dieser Zentralkörper, der nach Buscalioni ein Schleimkörper, corpo mucilaginoso, sein soll, tritt bei Betrachtung der Objekte in Kanadabalsam deutlich hervor, wobei die Kristallmasse unsichtbar wird. Der Körper löst sich nicht in Äther, Alkohol, Chloroform, Schwefelsäure; er ist langsam in Chromsäure löslich, wird von Jodalkohol schwach gelb und auch von Osmiumsäure und Eisenchlorid gelblich gefärbt. Die Substanz ist färbbar mit Anilinblau, Alkannatinktur, Methylenblau, Säurefuchsin und bildet grüne Kupferverbindungen. Buscalioni[2]) bringt 1 cm lange Stücke kalziumoxalatreicher Pflanzen auf einen Monat in eine konzen-

[1]) F. Mayer, System.-anatom. Unters. der Pogostemoneae Reichenb., Erlangen, Dissertation, 1909, S. 39.

[2]) L. Buscalioni, Studii sui cristalli di ossalato di calcio, Malpighia 1895, IX, S. 469, 1896, X, S. 3.

trierte wässerige Lösung von Kupfersulfat oder Kupferazetat, stellt Mikrotomschnitte her, behandelt diese 1 bis 2 Tage im Thermostaten bei 38° mit 1—30% Essigsäure zur Lösung des Kupferniederschlags und färbt schließlich. Man wird den Schlußfolgerungen, daß es sich hierbei um einen schleimartigen Stoff (Pektin) handelt, nicht völlig beistimmen können. Es scheinen vielmehr verschiedene Stoffe am Aufbau des Zentralkörpers beteiligt zu sein und darunter vornehmlich Fette. Es gelang wiederholt den Kern in alkoholischem Chloralhydrat zu lösen und die Reaktionen von Buscalioni scheinen mir ebenfalls für die Gegenwart fettartiger Substanzen zu sprechen.

Raphiden sind nadelförmige Kristalle des monoklinen Systems. Sie sind meist gleichsinnig zu Bündeln vereint, die stets von einer Gummischleimhülle eingeschlossen sind (Fig. 26, S. 107). In der Epidermis sind Raphiden selten. Die Randzellen der kreiselförmigen Schuppenhaare am Pistill von Cocos nucifera sind mit je einem Raphidenbündel erfüllt[1]). Das Gewicht einer einzelnen Raphide von Agave mexicana berechnet Andrews zu 0,0000038 mg (Lit. S. 18, 1).

Sphärite sind selten. Zuerst machte v. Höhnel[2]) auf sie aufmerksam bei Terminalia, dann Hegelmaier[3]) bei den Samenschalen der Caryophyllaceen und Moebius[4]) bei Mamillaria, Cereus und Phyllocactus, sowie bei Broussonetia, bei der sie im Endokarp auftreten, 18—25 μ lang werden und von der Wand einseitig umwachsen werden. Die Sphärite leuchten bei gekreuzten Nicols farbig auf, die der Cacteen zeigen ein orthogonales schwarzes Kreuz, nicht aber die von Broussonetia. Die Sphärite in Phallus caninus hält de Bary [5]) für oxalsauren Kalk.

Von Wehmer[6]) wurde wiederholt die Vermutung ausgesprochen, daß Raphiden und Sphärokristalle bei Phanerogamen aus Zitraten bestehen und nicht aus Kalkoxalat. Hierfür spricht einmal die Form. Es ist bisher noch nicht gelungen, Raphiden künstlich aus oxalsaurem Kalk herzustellen. Wehmer weist mit Recht darauf hin, daß Zitronensäure und ihre Salze den makrochemischen Befunden zufolge eine große Verbreitung besitzen, während die mikrochemischen Angaben hierüber recht spärlich sind. Es ist beachtenswert, daß man die kalkfreien Kristalle der Agaricinsäure (S. 152), die der Zitronensäure nahesteht, ebenfalls für Kalziumoxalate gedeutet hat.

[1]) M. Moebius, Über Raphiden in den Epidermiszellen. Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 485.

[2]) Fr. v. Höhnel, Beitr. z. Anat. u. Phys., Bot. Ztg., 1882, XL, S. 177.

[3]) F. Hegelmaier, Jahrb. f. wiss. Bot., 1874, IX, S. 286.

[4]) M. Moebius, Sphärokrist. v. Kalkoxalat b. Cacteen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1885, III, S. 178 u. Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, XXXIV, S. 425.

[5]) A. de Bary, Morph. u. Biol. d. Pilze, 2. Aufl., S. 12.

[6]) C. Wehmer, Zur Charakteristik des zitronensauren Kalkes und einige Bemerkungen über die Stellung der Zitronensäure im Stoffwechsel, Ber. deutsch. bot. Ges., 1892, XI, S. 333.

Kristallsand besteht aus sehr kleinen tetragonal-hemiedrischen Kriställchen, die zu vielen in einer Zelle auftreten. Die dicht gelagerten Kriställchen halten Luft zurück, so daß Kristallsandzellen in den Präparaten oft schwarz erscheinen.

In der mikrochemischen Feststellung von Oxalatkristallen wird ungemein leichtfertig vorgegangen. Gewöhnlich betrachtet man Kristalle, die sich in Chloralpräparaten vorfinden, als genügend identifiziert, wenn sie sich nicht in Essigsäure, wohl aber ohne Gasentwicklung in verdünnter Salzsäure lösen und mit Schwefelsäure Nadeln geben. So sind vielfach Irrtümer in der Literatur entstanden. Daß die sichere Diagnose von Oxalatkristallen nicht immer leicht ist, erhellt am besten aus der Tatsache, daß wiederholt Zellkerne mit Oxalat verwechselt wurden (s. Zellkern) und daß andererseits andere Substanzen irrtümlich für Oxalate angesprochen wurden. Derartige Unstimmigkeiten finden sich sogar in wiederholt untersuchten Objekten. Um nur ein Beispiel anzuführen, kommen nach J. Moeller, A. Meyer und Tschirch in den Crocusnarben Oxalate vor, während diese nach Molisch und nach der eingehenden Studie von Müller[1]) bestimmt fehlen.

Zunächst ist zu beachten, daß in Chloralpräparaten, zumal in älteren, eine gänzliche oder teilweise Lösung der Oxalate erfolgen kann, falls das Chloralhydrat salzsäurehaltig ist (s. S. 33). Ebenso werden Oxalate in Chlorzinkjodlösung, die oft Salzsäure enthält, meist gelöst. Die Oxalate sind unlöslich in Wasser, auch beim Kochen und in Essigsäure. Da der Essigsäure bei der Diagnose eine große Bedeutung zukommt, so ist daran zu erinnern, daß Oxalate nicht nur mit Zellulosehüllen, sondern zuweilen auch mit Schleimhüllen umgeben sind, die das Eindringen der Essigsäure hindern können. Man muß unter Umständen größere Quantitäten Essigsäure anwenden und längere Zeit einwirken lassen. Ferner ist Kalkzitrat ziemlich schwer in Essigsäure löslich und traubensaurer Kalk ist in Wasser und in Essigsäure unlöslich. Letzterer löst sich aber in Kalilauge und bleibt darin gelöst, während der oxalsaure Kalk in das Kalium-Kalk-Doppelsalz übergeht.

Weitere Identitätsreaktionen geben die Mineralsäuren. Oxalate lösen sich in verdünnter Salpeter-, Salz- und Schwefelsäure. Bei der Lösung in Salzsäure dürfen Gasblasen nicht auftreten (Unterscheidung von Karbonaten, s. S. 99). Mit Schwefelsäure müssen sich Gipskristalle bilden, die ebenfalls mikrochemisch zu identifizieren sind (s. S. 117). Zur Unterscheidung von nativ vorkommenden Gipskristallen dient Chlorbaryumlösung. Gipskristalle überziehen sich in dieser mit einer Kruste von Baryumsulfat (Kohl), während Oxalate unverändert bleiben.

[1]) R. Müller, Über die vermeintlichen Oxalatkristalle im Safran, Ztschr. d. allg. österr. Apoth.-Ver., 1903, XLVII, Nr. 29, Sep.

Bei vorsichtigem Glühen geben die Oxalate kohlensauren Kalk, der in Säuren aufbraust, während bei starkem Glühen Ätzkali entsteht.

Wenn die angeführten Reaktionen sämtlich positiv ausfallen, dann kann mit einiger Sicherheit auf oxalsauren Kalk geschlossen werden.

In den Membranen der Acetabularien kommt neben kohlensaurem Kalk auch oxalsaurer Kalk vor, der nach Behandlung mit verdünnter Essigsäure in größeren Körnern („sphärolithische Bildungen") zurückbleibt (Leitgeb[1]). In Lupinus albus (Samen) soll gelöstes Kalziumoxalat in loser Bindung mit freier Oxalsäure und mit Zitronensäure vorkommen (Belzung)[2].

Magnesiumoxalat kommt nach Monteverde[3]) in den getrockneten Blättern vieler Paniceen vor. Bei Setaria viridis findet es sich auch in den lebenden Zellen. Es bildet unregelmäßige Aggregate oder stark doppelbrechende, radial gestreifte Sphärite und tritt überwiegend in der Epidermis, seltener im Mesophyll auf. Die Kristalle lösen sich schwer in Wasser, sind unlöslich in Essigsäure, löslich in Salzsäure (ohne Gasentwicklung), in Schwefelsäure (ohne Bildung von Gipskristallen), in Salpetersäure; nach Behandlung mit Kalilauge verlieren sie Doppelbrechung und Streifung und werden löslich in Essigsäure, mit Gipslösung geben sie Kristalle von Kalziumoxalat und bei Einwirkung einer ammoniakalischen Lösung von Chlorammonium und Natriumphosphat entstehen die charakteristischen Kristalle von Ammoniummagnesiumphosphat. — In Piper nigrum (Perikarp) finden sich Kristalle von Magnesiumoxalat, die in Kalilauge braun, in Chloralhydrat farblos erscheinen (W. Plahl, Arch. f. Ch. u. Mikr., 1912, V, S. 320).

Zum Nachweis der im Zellsaft **gelösten** oxalsauren Salze stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Überwiegend wird es sich um das saure Kaliumsalz handeln. Dieses läßt sich in Rumex-, Rheum- und Oxalis-Arten, vornehmlich in frischem Material aus dem Monat Mai ohne weiteres durch Eintrocknen der Präparate auf dem Objektträger zur Kristallisation bringen und nach Borodin prüfen (bei Zusatz einer gesättigten wässerigen Lösung von saurem oxalsaurem Kali Zunahme der Ausscheidung). Nach Knoll[4]) führen die ausge-

[1]) H. Leitgeb, Die Inkrustationen der Membran von Acetabularia, Sitzber. Wiener Akad., 1887, XCVI 1, S. 15.

[2]) E. Belzung, Sur l'existence de l'oxalate de calcium à l'état dissous, Journ. de Bot., 1894, VIII, S. 213.

[3]) N. A. Monteverde. Über die Ablagerung von Kalzium- und Magnesiumoxalat in der Pflanze, Bot. Centralbl., 1890, XLIII, S. 327.

[4]) F. Knoll, Über die Abscheidung von Flüssigkeit an und in den Fruchtkörpern verschiedener Hymenomyceten, Ber. d. bot. Ges., 1912, XXX. Gen.-Vers. Heft, S. 43.

schiedenen Tropfen der Fruchtkörper von Agaricaceen ebenfalls ein Kaliumsalz der Oxalsäure. Bei Atropa belladonna scheint das Vorkommen des Kaliumsalzes sehr vom Boden abhängig zu sein, im Juni war es im Blatte nicht nachweisbar. Natronsalze treten in Salsola und Salicornia auf.

Schimper[1]) benutzte zum Nachweis Uranylazetat. Ist die Menge an gelösten Oxalaten in den Präparaten nicht zu gering, dann bilden sich rhombische Kristalle von Uranoxalat. Die größeren Kristalle erscheinen gelb und leuchten im polarisierten Lichte stark auf.

Man kann ferner die gelösten Oxalate in den Präparaten durch Zusatz von Kalziumnitratlösung in Kalziumoxalate überführen und diese dann in bekannter Weise mikrochemisch identifizieren. Auch Kalziumchloridlösung (1 + 3) läßt sich zur Erzielung von Kalziumoxalat verwenden. Doch durchdringt die Lösung schwer das Gewebe, auch erscheinen die Kristalle nicht in den Zellen, sondern meist auf den Präparaten. Um die Kalziumoxalate in den Zellen zu erhalten, legte Gießler[2]) größere Pflanzenstücke in eine kochende, konzentrierte Kalziumchloridlösung. Steht eine Luftpumpe zur Verfügung, dann kann man mit Vorteil die Kalziumchloridlösung unter der Luftpumpe injizieren. Die auf diese Weise behandelten Pflanzenteile werden ausgewaschen und aus ihnen die Präparate hergestellt. Die Präparate zeigen nun die Oxalsäure als feinkörniges Kalziumoxalat, seltener kommt es zur Bildung von Sphäriten. Die Fällungen treten besonders deutlich bei Heranziehung von Vergleichspräparaten nicht behandelter Pflanzen hervor. Mit dieser Methode hat Gießler die größte Menge von gelösten Oxalaten in den peripheren Teilen der Organe nachgewiesen. Die unterirdischen Achsen enthielten nur wenig. Mikrochemische Reaktionen zur Identifizierung der Niederschläge (mit Essigsäure, Salzsäure, Schwefelsäure) sind hier ebenfalls erforderlich, denn auch Gerbstoffe werden als grauschwarze Massen niedergeschlagen und können Anlaß zur Verwechslung mit feinkörnigem Kalziumoxalate geben. Daher ist Aufhellen mit Chloralhydrat und polarisiertes Licht heranzuziehen. Zitronensaure Salze werden gleichfalls mitgefällt, das entstandene Kalkzitrat ist löslich in Essigsäure.

In Milchsäften scheinen gelöste Oxalate öfters vorzukommen (Convolvulus tricolor, Keimlinge, Czapek[3]), Apocynum cannabinum,

---

[1]) A. F. W. Schimper, Z. Frage der Assimilation der Mineralsalze durch die grüne Pflanze, Flora, 1890, LXXIII, S. 215.

[2]) R. Gießler, Die Lokalisation der Oxalsäure in der Pflanze, Jenaer Ztschr. f. Naturwiss., 1893, N. F. XX, S. 344.

[3]) Fr. Czapek, Zur Kenntnis des Milchsaftsystems der Convolvulaceen, Sitzber. Wien. Akad., 1894, CIII, 1, Sep. S. 13.

Wurzel, Tunmann)[1]. Kocht man Präparate einige Minuten mit Wasser auf, dann scheiden sich kleine oktaederförmige Kristalle von Kalziumoxalat ab. Diese bilden sich nicht, wenn man den Milchsaft oder die Parenchymzellen für sich kocht. Mit Kalziumchlorid ist Oxalat im Milchsaft, mit Schwefelsäure Kalzium im Parenchym nachweisbar. Die Oxalsäure stammt somit aus dem Milchsafte, das Kalzium aus dem Parenchym.

Apfelsäure.

Apfelsäure (Monoxybernsteinsäure), 1785 von Scheele entdeckt, technisch aus unreifen Vogelbeeren (8%) gewonnen, gehört neben der Oxalsäure zu den verbreitetsten Pflanzensäuren. Sie tritt teils frei auf, teils an Kalium, Natrium, Kalzium, organische Basen gebunden. Ganz allgemein ist ihr Vorkommen in Früchten (Sorbus, Cydonia, Pirus malus); beim Reifen der Früchte schwindet sie. Durch hohen Gehalt zeichnen sich viele Succulenten (Crassulaceen) aus; besonders die Milchsäfte führen Apfelsäure (Euphorbium, Droge, führt 24% sauren, apfelsauren Kalk), ferner der Birkensaft, Polygonaceen (Rheum bis 3%), Solanaceen (Nicotiana, bis 3% saures apfelsaures Ammonium). Auch in Kryptogamen ist sie weit verbreitet, Polyporus-Arten, Psalliota, Equisetum, Angiopteris. Bei den Succulenten erfolgt in der Nacht vermehrte Bildung und Anhäufung von Apfelsäure. Warburg bringt diese Vorgänge mit der Chlorophylltätigkeit in Beziehung, Czapek[2]) schreibt ihnen „die ökologische Bedeutung zu, den Gaswechsel bei Xerophyten möglichst sparsam und nutzbringend zu gestalten". Nach Euler[3]) entsteht sie bei der Veratmung von Kohlehydraten.

Der mikrochemische Nachweis der Apfelsäure ist schwierig. Über die Apfelsäure der Crassulaceen gibt Brenner[4]) nur an, daß sich „in allen Zellen sehr leicht ein lösliches Kalksalz, offenbar saurer apfelsaurer Kalk, in großer Menge nachweisen läßt" (Schwefelsäure, Oxalsäure), sowie daß beim Zusatz von Salpeterlösung „vor der eigentlichen Plasmolyse innerhalb der Vakuolenflüssigkeit die gelösten Salze zu einem stark lichtbrechenden Tropfen oder Klumpen" ansammeln, der mit Schwefelsäure Gipskristalle liefert. Derartige Angaben sprechen nur für einen Kalkgehalt der betreffenden wasserlöslichen Verbindungen und können zu Irrtümern Anlaß geben, selbst dann, wenn makrochemisch für die zu untersuchenden Pflanzen die Anwesenheit von Apfelsäure erwiesen ist. Zunächst wird man darauf ausgehen, eine

---

[1]) O. Tunmann, Radix Apocyni cannabini, Pharm. Centralh., 1908, XLIX, S. 304.

[2]) Fr. Czapek, Biochemie I, S. 428 und II, S. 428, dort die Literatur.

[3]) H. Euler, Zur Kenntnis der Assimilationsvorgänge, Ztschr. f. phys. Chem., 1909, LIX, S. 122.

[4]) W. Brenner, Untersuchungen an einigen Fettpflanzen, Basler Dissert., 1900, S. 9.

etwas größere Menge der apfelsauren Verbindungen zu gewinnen. Bei Pflanzen, in denen die Apfelsäure in reichlicher Menge auftritt, gelingt dies relativ leicht durch Austrocknen des ausgepreßten Zellsaftes oder durch Einlegen größerer Pflanzenstücke in 65—70% Alkohol. In letzterem Falle scheiden sich die Kristalle an der Oberfläche der Stücke oder auf den Schnittflächen und in der Nähe dieser in größerer Menge aus. Tangentialschnitte der eingelegten Stücke werden die meisten Kristalle führen. Die Ausscheidung erfolgt übrigens recht langsam.

In den Präparaten werden die Kristalle nach dem Borodinschen Verfahren geprüft, wobei zu erinnern ist, daß sowohl saure als neutrale Salze vorliegen können. Kristalle von neutralem apfelsauren Kalk



Fig. 38. Maleinsäure und Maleinsäureanhydrid im Sublimat *a*) von Sorbus aucuparia (Frucht) *b*) von Euphorbium (Droge) (Tunmann).

werden bei Zusatz einer gesättigten wässerigen Lösung von neutralem apfelsauren Kalk wachsen und sich bei Zusatz einer wässerigen Lösung von saurem apfelsauren Kalk, weinsaurem Kalk und dergl. auflösen. Aus dem Rückstand des Zellsaftes oder dem in Alkohol eingelegten Material werden die Kristalle isoliert, evtl. durch Umkristallisieren gereinigt. Bringt man einige Kriställchen mit der Platinnadel in die Reduktionsflamme, dann wird Apfelsäure durch den charakteristischen Geruch an Bernsteinsäure angezeigt. Der gleiche Geruch würde bei Weinsäure auftreten, doch schwillt nach Belzung und Poirault[1]) weinsaurer Kalk beim Erhitzen nicht an und gibt bei der Kristallisation aus Alkohol makroskopisch sichtbare Nadeln, während die Kristalle von apfelsaurem Kalk nur mikroskopisch zu erkennen sind.

[1]) E. Belzung et G. Poirault, Sus les sels de l'Angiopteris evecta et en particulier le malate neutre de calcium, Journ. de Bot., 1892, VI, S. 286.

Die neutralen Alkalisalze kristallisieren selbst aus reinen Lösungen nur langsam aus, die sauren Salze kristallisieren leichter und sind luftbeständig. Meist wird es sich um das saure Kalziummalat handeln, das in kaltem Wasser schwer löslich ist (1 : 78) und zuweilen in, allerdings schlecht ausgebildeten. rhombischen Oktaedern in Glyzerinpräparaten erscheint. Das neutrale Kalksalz ist leichter in Wasser löslich und bildet feine Blättchen oder in lockeren Sphärokristallen angeordnete Nadeln. Apfelsaures Magnesium kristallisiert in rhombischen Säulen. Außerdem lassen sich apfelsaure Salze in neutraler Lösung mit Silbernitrat nachweisen. Es entstehen Sphärokristalle von Silbermalat, die sich in Ammoniak leicht auflösen und sich beim Eintrocknen der Lösung wieder als Kristallwarzen ausscheiden[1]). Freie Apfelsäure fällt hierbei hauptsächlich in 4- oder 8eckige Blättchen aus[2]).

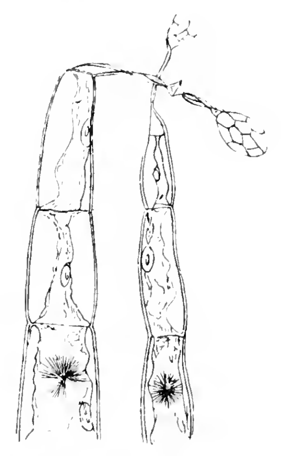


Fig. 39. Malatsphärite in Nicotiana tabacum (Trichome), getrocknetes Material in Alkohol (Tunmann).

Sowohl bei Milchsäften, Auszügen als auch bei Schnitten kommt ferner die Mikrosublimation in Betracht. Apfelsäure gibt bekanntlich ein Sublimat, das aus Maleinsäure (prismatische Kristalle mit schiefen Endflächen, die Gipskristallen ähneln) und aus Maleinsäureanhydrid (rhombische Täfelchen) besteht. Bei der Sublimation von Euphorbium (Handelsdroge) gelangen im Sublimat nach 24 Stunden Zerrformen von Maleinsäure und -anhydrid zur Ausscheidung (Tunmann)[3]). Bei Benutzung reichlicher Substanzmengen (0,01 g) sind die Kristalle makroskopisch sichtbar als filzartiger dichter Rasen, der wie eingetrocknetes Chloralhydrat aussieht. Die Maleinsäure gelangt dabei auch in Sphärokristallen zur Kristallisation (Fig. 38b). Bei den Crassulaceen muß man ein größeres Blattstück (1 qcm) zur Sublimation bringen, von dem man zuvor vorteilhaft die Kutikula, resp. die Epidermis, abgezogen hat. Die Kristalle bilden sich auch hier erst nach mehreren Stunden; es sind meist federförmige Kristallskelette, die zu „Sternen und Sonnen“ vereinigt sind. Auch Alkoholmaterial kann benutzt werden. Ein gutes Versuchsobjekt ist Sorbus aucuparia (Fig. 38a). Zur Sublimation ist eine höhere Tempe-

---

[1]) K. Haushofer, Mikr. Reakt., S. 67.

[2]) F. Emich, Mikrochemie, S. 143.

[3]) O. Tunmann, Vergl. Unters. über die Mikrosublimationsmethoden, Apoth.-Ztg., 1912, XXVII, S. 494.

ratur erforderlich. Die Spaltlinge der Apfelsäure gehen erst über, wenn der Schnitt im Verkohlen ist und schwarz wird!

Die in den getrockneten Tabakblättern beim Einlegen in Alkohol sich ausscheidenden Sphärite (Fig. 39), die in lebenden Blättern nicht zugegen sind, lassen sich durch Essigsäure sichtbar machen (Schimper)[1], lösen sich langsam in Wasser und in Mineralsäuren, sind unlöslich in Alkohol, Äther, Glyzerin, blähen sich beim Verkohlen auf und sind jedenfalls ein apfelsaures Salz (Molisch, Histochemie, S. 38). In der Tat erhalten wir bei der Sublimation der mit Essigsäure aufgehellten und mit Alkohol ausgewaschenen Blätter typische Kristalle von Maleinsäureanhydrid (Tunmann, Apoth.-Ztg. 1912, S. 973). Auch die Kalziummalate des Birkensaftes (Betula lenta) sind in kaltem Alkohol schwer löslich[2]. Diels[3], der die Zersetzung der Chloride in Halophyten verfolgte, fand in den von ihm untersuchten Pflanzen ebenfalls Apfelsäure und Dębski[4]) deutet den braunen Niederschlag, den Bleiazetat in Blättern und Blattstielen der Marantaceen erzeugt, auf diese Säure. Über die Sphärite, die durch 70% Alkohol in kaktusähnlichen Euphorbien (Belzung) und in Equisetum (Tunmann) entstehen und die möglicherweise Kalziummalophosphat sind, s. S. 93 u. 94.

Fumarsäure.

Die Fumarsäure ist bis jetzt noch nicht näher studiert worden, doch ist es nach den bei der Apfelsäure gemachten Erfahrungen wahrscheinlich, daß sie sich ebenfalls durch direkte Sublimation aus den Schnitten heraussublimieren läßt, wenigstens überall dort, wo sie in größerer Menge auftritt. Kristalle von Fumarsäure wird man zuweilen in den ersten Sublimaten unreifer Sorbusfrüchte antreffen. Sie erscheinen als einzeln liegende kurze Prismen, die bei Wasserzusatz noch einige Minuten erhalten bleiben.

Weinsäure und Traubensäure.

Weinsäure (Weinsteinsäure, Dioxybernsteinsäure), in reinem Zustande von Scheele 1768 gewonnen, ist eine der weitverbreitetsten Pflanzensäuren, die sowohl frei als auch an Kalium oder Kalzium gebunden in den Pflanzen auftritt. Sie

[1]) A. F. W. Schimper, Anleitung zur mikroskopischen Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel, 1888.

[2]) W. Lenz, Über Birkensaft, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1909, XIX, S. 323.

[3]) L. Diels, Stoffwechsel und Struktur der Halophyten, Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXII, S. 309.

[4]) B. Dębski, Über den Bau und den Bewegungsmechanismus der Blätter der Marantaceen, Anzeiger d. Krakauer Akad., 1895. S. 244.

findet sich vorzugsweise in Früchten (Tamarindus indica, Vitis vinifera; Sorbus aucuparia), in Samen (Myristica), in Blättern (Vitis vinifera, Chelidonium majus, Rumex acetosa), aber auch in Wurzeln (Evonymus europaea, Runkelrüben, Rubia tinctorum, Leontodon taraxacum), Knollen (Helianthus) und selbst in niederen Pflanzen, so in Gefäßkryptogamen (Lycopodium complanatum), in Flechten (Usnea barbata, Zeorina sordida) und in Pilzen (Cantharellus cibarius).

Weinsäure bildet große monokline Prismen, die sich leicht in Wasser und in Alkohol, schwerer in Äther lösen. Saures Kaliumtartarat scheidet sich, meist gemengt mit Kalziumtartarat als Weinstein bei Wasserentzug (Alkoholmaterial, getrocknete Pflanzen) in undeutlich kristallinischen Schollen, Klumpen und Krusten ab, die unlöslich in Äther sind. Die Weinsteinklumpen in Drogen und Herbar-

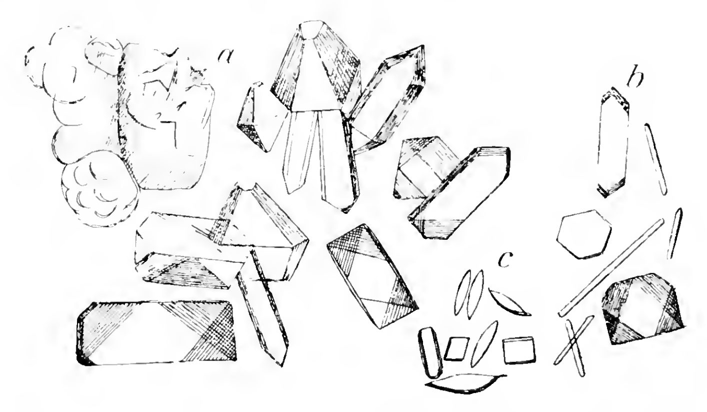


Fig. 40. *a*) Isolierter Weinsteinballen aus dem Fruchtfleisch der Korinthe (links oben), der mit Kalziumchlorid typische Kristalle von Kalziumtartarat bildet und *b*) mit verd. Kalilauge Kristalle des sauren Kalisalzes liefert: *c*) Kristalle von Traubensäure (Kaliumsalz) (Tunmann).

material, die oft makroskopisch sichtbar sind und eine Freipräparation gestatten (Korinthen), sind nicht einheitlicher Natur, worauf die Beobachtung der Lösungsvorgänge im polarisierten Lichte hinweist. Es werden vielmehr schlecht ausgebildete Weinsteinkristalle durch Zucker, Pektine, Schleime u. a. untereinander verkittet (Fig. 40a). Auch neutrale und saure Kalziumtartarate (erstere in Blättern von Vitis, letztere in Früchten von Rhus typhina), die sich sehr wenig in Wasser, leicht in 10% Kali- und Natronlauge lösen, sowie Aluminiumtartarate (Lycopodium clavatum) treten auf. Die neutralen Kaliumtartarate lösen sich leicht in Wasser, die sauren Salze sind unter Deckglas nur bei größerem Wasserzusatz nach längerer Zeit in Lösung zu bringen. Kristallausscheidungen von neutralem Kalziumtartarat, die ebenfalls dem rhombischen System angehören, wurden von Schimper (l. c. S. 238)

in vergilbten Blättern und Blattstielen von Vitis und Ampelopsis aufgefunden und eingehend studiert. Sie lösen sich kaum im Wasser, sofort in 10 % Kalilauge, sowie in 2—3 % Essigsäure. In konzentrierter Essigsäure sind sie unlöslich. Hat man somit die Kristalle in verdünnter Essigsäure gelöst, dann erfolgt bei Zusatz von konzentrierter Säure wiederum ein Auskristallisieren von Kalziumtartarat. Beim Glühen gehen die Kristalle in schaumige Massen über, die sich in 10 % Essigsäure leicht lösen.

Der mikroskopische Nachweis der Weinsäure wird vorteilhaft mit essigsaurem Kalium oder mit Chlorkalzium geführt (Schimper[1]). Die Präparate dürfen zuvor nicht gewässert haben. Sie kommen auf dem Objektträger in einen kleinen Tropfen Wasser, werden durchmustert, um event. bereits vorhandene Ausscheidungen festzustellen; man läßt eintrocknen. Alsdann fügt man eine wässerige Lösung von essigsaurem Kalium (1 : 10) zu. Es bilden sich nach einigen Minuten rhombisch-hemiedrische Kristalle von saurem Kaliumtartarat, die in Essigsäure löslich sind. Ähnliche Kristalle erhält man zuweilen beim Aufhellen der Präparate mit Kalilauge. In vielen Fällen gelingt ferner die Reaktion mit wässeriger Kalziumchloridlösung (1 : 10). Es bilden sich charakteristische Kristalle von Kalziumtartarat (Kombinationen von langgestrecktem Prisma und Doma u. a.), die sich leicht in verdünnter (2 %), schwer in konzentrierter Essigsäure lösen. Zur Diagnose von saurem Kalziumtartarat ist diese Reaktion sehr geeignet: kocht man Weinsteinausscheidungen mit Kalziumchlorid unter Deckglas auf, dann gehen sie in die charakteristischen über 100 μ großen Kristalle von Kalziumtartarat über (Fig. 40a); auch wenn größere Mengen Kalziumtartarat im Weinstein zugegen sein sollten, so erscheinen diese erst nach der Reaktion in typischer Form.

Behandelt man Schnitte mit Weinsteinballen mit Kalilauge, so scheiden sich nach einigen Stunden Kristalle des sauren Kalisalzes in typischer Form aus, daneben aber auch kurze Nadeln (Fig. 40b). Ähnliche Kristalle erhält man beim Aufkochen der Schnitte in Wasser und nachfolgenden Zusatz von Alkohol.

Hat man etwas länger aufgekocht, bis etwa die Hälfte des Wassers unter dem Deckglase verdampfte, und der noch heißen Lösung Alkohol zugefügt, dann wird man nach 10 bis 12 Stunden und teilweiser Verdunstung regelmäßig kleine Kristalle von Traubensäure antreffen (Kaliumsalz) (Fig. 40c). Es sind teils flache Täfelchen, teils Kristalle von Wetzsteinform, die Diatomeen nicht unähnlich sind. Letztere

[1]) A. F. W. Schimper, Zur Frage d. Assimilation der Mineralsalze d. d. grüne Pflanze, Flora 1890, LXXIII, S. 220.

Formen sind für die Traubensäure typisch. Aufkochen der Schnitte mit stark verd. Kalilauge liefert ebenfalls vereinzelte Kristalle von Traubensäure.

Als Hilfsreaktionen zum Nachweis der Weinsäure können dienen: Silbernitrat (kleine, wenig charakteristische Täfelchen, zuweilen knieförmig verwachsen), konz. Kaliumdichromat (gibt im Gegensatz zur Zitronensäure schwarze Färbung; in Früchten und Blättern, überhaupt im Gewebe des Gerbstoffes wegen nicht anwendbar), sowie Erhitzen mit Resorcinschwefelsäure (1 : 100, violettrote Färbung, die auch Polysaccharide geben).

Zitronensäure.

Zitronensäure, Oxytricarballylsäure, im kristallinischen Zustande zuerst von Scheele 1784 hergestellt, technisch aus Zitronen (7—9%) gewonnen, gehört zu den verbreitetsten Pflanzensäuren. Vorzugsweise findet sie sich in Früchten, teils für sich allein (Citrus, Vacciniumarten), teils neben Apfel- und Weinsäure (Tamarindus), teils neben Apfelsäure (Rubus idaeus, Ribes grossularia und nigrum). Auch in Samen (Lupinus), in Blättern (Convallaria, Erica, Nicotiana, Aconitum, Isatis u. a.), in Knollen (Dahlia, Helianthus) und Zwiebeln (Allium cepa) tritt sie vielfach auf. Gebunden kommt sie überwiegend als Kalksalz vor (Zwiebeln von Allium und Urginea); Magnesiumzitrat findet sich in Sorghum saccharatum. In Pilzen ist sie ebenfalls gefunden worden. Eine Anzahl Pilze (Citromyces, Penicillium luteum) bilden in Kultur auf kreidehaltiger Zuckerlösung Kalziumzitrat.

In der Literatur trifft man nur wenig Angaben über den Nachweis der Zitronensäure im Gewebe an, trotzdem sie so häufig vorkommt, weil der sichere Nachweis recht schwer ist und die makrochemisch benutzten Reaktionen mehr oder weniger versagen. Überwiegend werden die Zitrate in der Zelle in gelöster Form vorliegen.

Wehmer[1]) erhielt bei der Kultur von verschiedenen Pilzen in kreidehaltiger Zuckerlösung Kalziumzitrat, welches beim Erwärmen in Form von Sphäriten und Raphiden ausfiel. Die vielfachen Befunde über die Bildung von Kalziumzitratraphiden drängten Wehmer zur Überzeugung, daß die Raphiden höherer Pflanzen wahrscheinlich aus Kalziumzitrat und nicht aus Kalziumoxalat bestehen.

In Alkoholmaterial und in Schnitten, die längere Zeit in Glyzerin oder in Wasser lagen, finden sich zuweilen (nicht immer) Abscheidungen von Kalkzitraten[2]). Mit Kalziumchlorid lassen sich analoge Fällungen in Schnitten hervorrufen, aber nur bei Gegenwart größerer Mengen Zitronensäure. Es ist ratsam, die Schnitte zuvor mit etwas verd. Natronlauge zu versetzen. Die Fällung entsteht erst beim Kochen.

[1]) C. Wehmer, Charakteristik des zitronensauren Kalkes. Ber. deutsch. bot. Ges., 1893, XI, S. 333.

[2]) E. Belzung, Journ. de Bot., 1891, V, S. 25.

ist aber wenig charakteristisch. Die für neutrales Kalkzitrat charakteristische Wetzsteinform erhält man nur selten. Das Kalkzitrat unterscheidet sich nun von den gleichzeitig mitgefällten Oxalaten durch seine Löslichkeit in Essigsäure, von den Kalksalzen anderer organischer Säuren durch seine Unlöslichkeit in Wasser (Malate [nicht alle s. S. 146]. Tartarate lösen sich nach wiederholtem Durchsaugen von Wasser).

In der Chemie werden noch folgende Reaktionen herangezogen: mit Silbernitrat (durch Umkristallisieren aus heißem Wasser Nadeln, Stäbchen, meist aber sehr kleine tropfenartige Bildungen), mit Wismutnitrat und etwas freier Salpetersäure, sowie mit Baryumchlorid (kleine Körner und Prismen).

Überall dort, wo der Gehalt an Zitronensäure ein hoher ist, wird man die direkte Sublimation heranziehen können (Tunmann[1]). Ein



Fig. 41. Sublimat reiner Zitronensäure (Citraconsäureanhydrid) **links**. Sublimat des Fruchtfleisches der Zitrone, **rechts**: durch die mitgerissenen Wasserdämpfe ist das Anhydrid überwiegend in Citraconsäure übergegangen (Tunmann).

kleiner Schnitt aus dem Fruchtfleisch der Zitronen gibt mehrere Sublimate. Gewöhnlich sind am Rande der Sublimate federartige Kristallskelette und „bastfaserartige" Formen mit abgerundeten Endflächen von Citraconsäureanhydrid, wie diese im Sublimat von reiner Zitronensäure zugegen sind. Bei der Sublimation lebender Pflanzenteile werden aber Wasserdämpfe mitgerissen, wodurch das Anhydrid überwiegend in Citraconsäure übergeht. Dieses bildet gut entwickelte Einzelkristalle (bis 40 μ), die meist an Magnesiumammoniumphosphat (Sargdeckelform) erinnern, aber auch als monokline Blättchen ausgebildet sind. Letztere könnte man leicht für Itaconsäure halten, was sie aber nicht sind, da sie sich sehr leicht in Äther lösen (Fig. 41). Es erscheint angebracht, die Raphiden der Phanerogamen zu isolieren und der Sublimation zu unterwerfen.

[1]) O. Tunmann, Vergl. Untersuchungen über die Mikrosublimationsmethoden, Apoth. Ztg., 1912, XXVII, Nr. 52—54 u. 99.

Agaricinsäure.

Agaricinsäure, eine dreibasische Oxysäure[1]) (homolog der Zitronensäure), kommt zu 14—16 % in den Fruchtträgern von Polyporus officinalis Fries vor. Sie ist in Chloroform, Benzol und Wasser unlöslich, schmilzt bei 142° und bildet perlmutterglänzende Blättchen.

Über die Mikrochemie und die Lokalisation der Agaricinsäure berichtete Tunmann[2]). Wenn man etwas Agaricinsäure des Handels unter Deckglas in einem Tropfen Wasser erwärmt, dann löst sie sich unter Schaumbildung klar auf, und beim Erkalten scheidet sich eine zähe gelatinöse Masse ab, in der Tropfen suspendiert sind, die allmählich kristallinische Beschaffenheit annehmen. Kocht man sie unter Deckglas mit wässerigem Chloralhydrat, so kristallisieren aus der Lösung federförmige, manchmal gebogene Nadeln, seltener entstehen zierliche Nadelsterne. Kocht man nun ein Präparat aus den inneren Gewebepartien des Hutes mit Chloralhydrat und kühlt schnell ab, so wird das „Harz" in eine hyaline Masse übergeführt, aus der sich nach etwa 10 Minuten die gleichen Kristalle abscheiden. Bei vorangegangenem Zusatz von verdünnter Salzsäure fallen die Kristalle zarter und mehr baumartig gruppiert aus. Die Kristalle entstehen auch, wenn die Präparate vorher mit kaltem Wasser, mit Äther, Petroläther, Chloroform oder Benzol während einer Woche bei öfterem Umschütteln mazeriert wurden. Andererseits bleibt die Kristallbildung aus, wenn man die Präparate vorher mit Wasser aufkocht und auswäscht oder sie längere Zeit mit

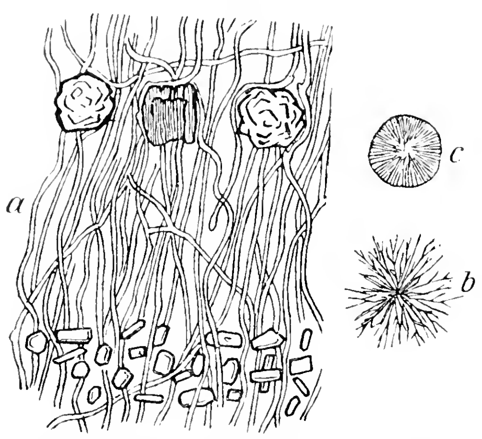


Fig. 42. Polyporus officinalis, *a*) Randschicht des Fruchtträgers mit Kristallen agaricinsaurer Salze; *b*) Agaricinsäure des Handels oder aus dem Gewebe mit Chloralhydrat zur Kristallisation gebracht; *c*) ebenso erhaltene Kristalle des γ-Harzes (?) (Tunmann).

[1]) H. Thoms u. J. Vogelsang, Zur Kenntnis der Agaricinsäure, Pharm. Centralh., 1907, XLVIII, S. 804, dort die chem. Lit.

[2]) O. Tunmann, Über die Bildung des Harzes, den mikrochemischen Nachweis der Harzsäuren und über die Kristalle in Polyporus officinalis Fries, Schw. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1909, XLVII, Nr. 11.

50 % Alkohol, Ammoniak oder alkoholischer Kalilauge behandelt hat. Aus diesen Löslichkeitsverhältnissen geht hervor, daß es sich um Agaricinsäure handelt, die sich mit Chloralhydrat mikrochemisch leicht nachweisen läßt. Das Chloral wirkt hier als Kristallisationsmittel. Die Reaktion spricht dafür, daß hier die Agaricinsäure in freiem Zustande auftritt (Fig. 42b).

Außer und neben der Agaricinsäure finden sich Sphärokristalle bei der Chloralhydrateinwirkung vor. In Präparaten aus dem Inneren des Hutes finden sie sich nur spärlich, in solchen der Randschicht treten sie dagegen zahlreich auf, namentlich wenn man die rotbraunen Partien prüft (Fig. 42c). Da nun die Agaricinkristalle sich bei längerem Liegen in 90 % Alkohol, besonders bei gelindem Erwärmen lösen, die Sphärokristalle aber hierbei unlöslich zurückbleiben, so läßt sich wohl annehmen, gestützt auf die makrochemischen Ermittelungen Schmieders, daß diese Sphärokristalle das γ Harz darstellen, welches demnach in größeren Mengen in der Randschicht auftritt, während die Agaricinsäure in den weißen inneren Teilen des Hutes lokalisiert ist. Letztere gibt mit Kupferazetat eine tiefgrüne, makroskopisch bereits sichtbare, Farbenreaktion. Die Färbung des „Harzes“ von Polyporus officinalis mit Kupferazetat kommt daher der Agaricinsäure zu. In der Randschicht des Hutes (Droge) finden sich Kristalle, die oft in regelmäßigen Reihen abgelagert sind; die großen sind bis 215 μ groß und entweder würfelförmige Gebilde, die sich aus Lamellen aufbauen, oder Drusen. Die kleinen Kristalle messen nur 8—32 μ, meist 10—15 μ (Fig. 42a). Den Reaktionen und Lösungsverhältnissen zufolge handelt es sich um Magnesium- und Kaliumverbindungen der Agaricinsäure.

Sorbinsäure.

Die ungesättigte Sorbinsäure wurde in reinem Zustande 1859 von A. W. Hofmann aus dem Safte der Früchte von Sorbus aucuparia isoliert.

Zum Nachweis kann die Sublimation dienen. Vorteilhaft verwendet man frische (noch wasserhaltige) Schnitte völlig reifer, roter Früchte von Sorbus aucuparia und sublimiert bei 5 cm hoher Flamme. Nach 4—5 Minuten erhält man ungemein typisch ausgebildete Kristalle (Fig. 43a). Auch die Blättchen, die an Asparaginkristalle erinnern, sind charakteristisch. (Reine Sorbinsäure, mit einem kleinen Tropfen Wasser bedeckt, gibt bei der Sublimation die gleichen Kristalle). Die in der reifen Frucht neben Sorbinsäure vorkommenden Körper, Sorbin und Sorbit, geben keine kristallinischen Sublimate. Bei Benutzung trockener Früchte erhält man zum Teil abweichende Kristallformen, da bei Wassermangel teilweise Zersetzung der Säure erfolgt.

Ist die Frucht nicht völlig reif, dann findet man in den Sublimaten Maleinsäure, umsomehr, je gelber und unreifer die Frucht ist. Maleinsäureanhydrid bildet die gleichen Täfelchen wie Sorbinsäure, löst sich aber sofort in Wasser und Essigsäure und gibt mit Silbernitrat nur Tröpfchen. Die Kristalle der Sorbinsäure des Sublimates lösen sich leicht in Alkohol, aber unter Deckglas in Wasser, Chlorzinkjod und Jodjodkalium erst beim Kochen. Aus heißem Wasser kristallisiert sie zum Teil in Drusen und Sphäriten. Eisenchlorid löst und färbt innerhalb einer Stunde nicht. Die folgenden beiden Reaktionen habe ich als diagnostisch brauchbar befunden. Silbernitrat führt den Kristall sofort in feine Nädelchen über, schließlich entstehen kleine Drusen und Sphärite; der Umriß des ursprünglichen Kristalles bleibt mehrere Stunden erhalten (Fig. 43c). Gesättigte Brombromkaliumlösung (s. Alkaloidreag.) verwandelt den Kristall sofort in tief braungelbe, ölige, glänzende Tropfen. Von Fettsäuren, die auch in Sublimaten auftreten können (s. d.), unterscheidet sich die Sorbinsäure dadurch, daß sie sich in Kalilauge-Ammoniak löst (keine Verseifungsprodukte).

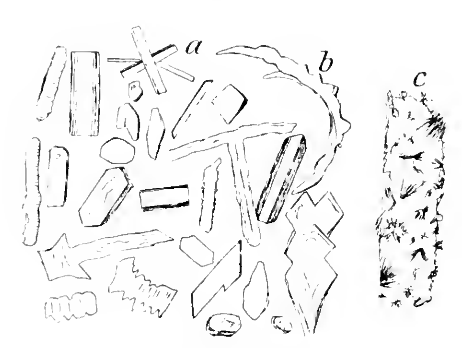


Fig. 43. Sorbus aucuparia. *a*) Sorbinsäurekristalle im Sublimat der reifen Frucht; *b*) Maleinsäure im Sublimat der unreifen Frucht; *c*) Sorbinsäurekristall bei Einwirkung von Silbernitrat (Tunmann).

Fette Öle und Fettsäuren (Glyzerin, Akrolein, Lezithin).

Die Säuren der Fettsäurereihe und der Ölsäurereihe verbinden sich mit Glyzerin zu neutralen zusammengesetzten Äthern (Glyzeriden), die, in wechselnder Quantität miteinander gemengt, Fette (fette Öle) bilden. Die Triglyzeride der Palmitin-, Stearin- und Ölsäure (Tri-palmitin, -stearin, -olein) bilden die Hauptmasse der Fette. Die flüssigen Fette führen in erster Linie Triolein, die festeren vorzugsweise Tripalmitin und -stearin. Außerdem finden wir Glyzeride der Butter-, Valerian-, Capron-, Capryl-, Caprin-, Laurin-, Myristin-, Arachinsäure, sowie Glyzeride ungesättigter Säuren aus der Reihe der Ölsäure (Tiglin-, Erukasäure), der Leinölsäure (Linolsäure) und von Oxyölsäuren (Rizinolsäure) u. a.

Die Fette zählen neben der Stärke zu den wichtigsten stickstofffreien Reservestoffen der Pflanze (Pollen, Sporen, Zwiebeln, Knollen, Wurzeln, Samen, Früchten). Bei Diatomeen sind sie das erste sichtbare Assimilationsprodukt, werden bei kräftigem Wachstum sofort verbraucht und bei Wachstumshemmung

gespeichert (Beijerinck). Geringe Mengen entstehen in Chromatophoren und Ölbildnern (s. d.), die Hauptmengen aber im Plasma (Wakker). Die Fetttropfen, oft noch von zarten mitgerissenen Plasmahäutchen umhüllt, sammeln sich später im Zellsaft an. Bei Naturhefen findet sie Henneberg in Vakuolen, bei Kulturhefen im Plasma verteilt, öfters um den Saftraum angehäuft. Im Samen liegen Fett-Eiweiß-Emulsionen vor (Ölplasma, Tschirch). In sehr fettreichen, alten Samen trifft man zuweilen Fettkristalle an. Zur Fettbildung dienen Glykosen, Mannit u. a., hauptsächlich Stärke. Sowohl die Mobilmachung der Fette (beim Keimen) als auch ihre Bildung bei der Speicherung im Samen (S. Ivanow) wird durch Lipasen ausgeführt. Bei der Ölsynthese sind zuerst die freien Fettsäuren nachweisbar. Im Samen vertritt Fett die Stärke, schließt sie aber nicht aus. Fett und Stärke finden wir im Samen von Theobroma, Myristica, Laurus u. a. Das Fett des Fruchtfleisches (Cornus, Oleaceen, Palmen) dient auch als Anlockungsmittel für Tiere zur Verbreitung der Samen. (Eine vollständige Übersicht der Analysen der Samenfette findet sich bei Czapek, Biochemie I, S. 115.) In den Stämmen einer Anzahl einheimischer Bäume (Fettbäume, weichholzig) geht im Oktober die Stärke mehr oder weniger vollständig in Fett über, dadurch soll eine Art Kälteschutz erreicht werden; Bäume, bei denen diese Umwandlung, die übrigens auch in den wintergrünen Blättern erfolgt, nicht vor sich geht, nennt A. Fischer Stärkebäume (hartholzig). F. Weber stellt den Kälteschutz in Abrede, Fett sei nur im Vergleich zur Stärke die beständigere Form des Reservestoffes. Den Übergang der Stärkekörner in Fetttropfen konnte A. Fischer in der feuchten Kammer (Fig. 2) mikroskopisch verfolgen; dabei fand keine Translokation statt. Doch vermögen Fette im fein emulgierten Zustande und als Seifen zu wandern (R. H. Schmidt). Eine Wanderung der Fette wurde mehrfach verneint, doch machen es eigene Befunde bei Alkaloidstudien wahrscheinlich, daß Fette als Transportmittel dienen, besonders von (schädlichen) schwer diosmierbaren Stoffen.

Die mikrochemische Diagnose der Fette ist leicht in Geweben, in welchen größere Quantitäten an Fett zugegen sind, schwierig überall dort, wo, wie in den vegetativen Teilen nur einige „fettglänzende" Tröpfchen zu identifizieren sind. Fallen bei diesen stark lichtbrechenden „Fetttröpfchen" die Reaktionen nur zum Teil positiv aus, so kann man nach meinen Befunden auf Körpergemische schließen, die nur mehr oder weniger große Anteile von Fett enthalten. Die Diagnose stützt sich auf Ermittelung der Lösungsverhältnisse, auf Färbungen mit Fettfarbstoffen und mit Osmiumsäure, sowie auf Verseifung und Bildung von Myelin. Löslichkeitsverhältnisse und Färbungen sind Hilfsreaktionen; Verseifung und Myelinbildung, sowie Nachweis der Fettsäuren durch Sublimation sind Hauptreaktionen.

Zur Orientierung werden die Löslichkeitsverhältnisse geprüft. Die pflanzlichen Fette sind löslich in Schwefelkohlenstoff, Äther, Petroläther, Chloroform, Azeton, Holzgeist, Phenol sowie in ätherischen Ölen. Um brauchbare Ergebnisse zu erhalten, nimmt man die Reaktionen

nicht nur unter Deckglas vor (mehrmaliges Durchsaugen des Reagens) unter gleichzeitiger mikroskopischer Beobachtung, sondern mazeriert die Schnitte in einem geschlossenen Glase 1 bis 3 Tage. Um Fette aus Samen (starkwandigem Endosperm) zu entfernen, ist sogar eine 8tägige Mazeration angebracht. Von A. Meyer (Das Chlorophyllkorn, 1883) wurde zur Unterscheidung der Fette von gleichzeitig anwesenden ätherischen Ölen wässerige Chloralhydratlösung (5 g Chloralhydrat, 2 g Wasser), sowie Eisessig empfohlen. Beim Durchsaugen der Reagentien unter Deckglas bleiben die meisten Fette ungelöst (eine Ausnahme bilden die Fette der Bakterien), während sich viele ätherische Öle lösen. Doch ist zu beachten, daß letztere in Drogen oft verharzt und dann in geringer Menge dieser Reagentien schwer löslich sind. Bei Drogen sind Harze häufig unter Deckglas völlig unlöslich in Chloralhydrat und in Eisessig. Auch die Löslichkeit der Fette in großen Mengen dieser Reagentien nimmt mit dem Alter der Pflanzenteile ab. So sind die eingetrockneten Fettmassen in den Secernierungszellen mancher Epidermaldrüsen selbst bei längerem Erwärmen und bei mehrtägiger Mazeration in wässerigem Chloralhydrat unlöslich (in dem sich die Harze lösen), können aber durch alkoholische Chloralhydratlösung zum Lösen gebracht werden. Empfehlenswert ist zuweilen die Anfertigung einer größeren Anzahl von Präparaten in wässerigem und alkoholischem Chloral von steigender Konzentration, die luftdicht verschlossen (Deckglasumrandung) einer mehrtägigen Dauerbeobachtung unterworfen werden (Tunmann, Ber. pharm. Ges., 1908, XVIII, S. 503).

Fette sind unlöslich in kaltem und heißem Wasser und meist nahezu unlöslich in Alkohol. Doch werden vom absoluten Alkohol von vielen Fetten Spuren gelöst, von anderen Fetten größere Anteile, die bei der mikrochemischen Reaktion bereits ins Gewicht fallen. Leinöl wird zu 7 %, Olivenöl zu fast 4 %, Leindotteröl zu 7,8 % gelöst und Rizinusöl und Krotonöl sind relativ leicht löslich in Alkohol. Es ist einleuchtend, daß kleine Tröpfchen, wie sie beispielsweise in den Blättern auftreten, leicht von absolutem Alkohol gelöst werden können, auch wenn sie echte Fette sind. Der Reaktion, bei der man auf die Beschaffenheit des Alkohols (absoluter, denn mit steigendem Wassergehalt sinkt die Löslickeit der Fette) zu achten hat, kommt nur ein orientierender Wert zu.

Bei Gegenwart sehr geringer Fettmengen wird man die Beobachtung machen, daß als erste Phase der Einwirkung des Lösungsmittels die sehr kleinen Tröpfchen zu größeren Fetttropfen zusammenfließen, bevor sie in Lösung gehen. Diese Erscheinung ist allgemein für Fette typisch und erleichtert den Nachweis geringer Quantitäten.

Färbungen der Fette mit den sogenannten Fettfarbstoffen[1]) sind seit langem in der Mikrochemie im Gebrauch. Sie färben aber auch die Harze, ätherische Öle, verkorkte und kutinisierte Membranen. Um ein teilweises Auflösen der Fette bei der Färbung auszuschließen, darf der Alkoholgehalt der Farblösung 70% nicht übersteigen. Als Waschflüssigkeit dient 50% Alkohol, außerdem Glyzerin, in dem auch beobachtet wird. Für sich allein sind die Farbenreaktionen nicht beweisend, zumal wir nicht wissen, ob sich andere Körper organischer Natur ebenfalls färben. Doch sind die Färbungen wichtige Hilfsreaktionen.

Es ist nun vielfach Brauch aus den gefärbten Präparaten ohne weiteres Schlüsse zu ziehen. Die Färbungen sollen uns indessen in erster Linie auf die fraglichen Gebilde hinweisen, besonders kleinere Tröpfchen deutlicher hervortreten lassen. Es ist unerläßlich, an den gefärbten Präparaten die für Fette charakteristischen Löslichkeitsverhältnisse auszuproben, vornehmlich zu ermitteln, ob sich alle gefärbten Tropfen beim Durchsaugen von Chloralhydratlösung oder von Essigsäure nicht lösen. Lassen sich doch die Wirkungen der Lösungsmittel an gefärbten Präparaten weit klarer verfolgen als an ungefärbten.

Von den Farbstoffen haben sich Alkannin, Sudan III und Scharlach R am meisten eingeführt.

Alkannin: Der Farbstoff der Alkanna ist schon lange (s. Harze) ein beliebtes Tinktionsmittel. Zimmermann[2]) benutzte eine konzentrierte Lösung von Alkannin in absolutem Alkohol (durch mehrtägige Mazeration hergestellt), verdünnt diese mit dem gleichen Volumen Wasser und filtriert. Die Lösung ist haltbar. Die Schnitte werden über Nacht in einem geschlossenen Behälter in dem Reagens belassen. Fette, aber auch ätherische Öle, Harze, verkorkte und kutinisierte Membranen sind alsdann tiefrot gefärbt. Doch dürfen die Schnitte aus der Farblösung nicht direkt in Glyzerin oder Wasser übertragen werden, da hierbei das überschüssige Reagens sich teils in roten Tropfen ausscheidet und Irrtümer veranlaßt, teils durch amorphe Fällungen die Präparate unklar macht. Aus der Alkanninlösung gelangen die Schnitte zunächst in 50%, dann in 30—40° Alkohol und werden nun erst in konzentriertem oder verdünntem Glyzerin untersucht.

Das in der tierischen Histologie von Daddi[3]) empfohlene und in

---

[1]) Fettfarbstoffe sind indifferente fettlösliche Farbstoffe oder schwache Farbsäuren und Farbbasen. Die Fettfärbung ist ein physikalischer Lösungsvorgang; hierzu vergl.: Ph. Eisenberg, Über Fettfärbung, farbchemische und histologischtechnische Untersuchungen, Virchow Arch. 1910, CXCIX, S. 502.

[2]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik, 1892, S. 69.

[3]) L. Daddi, Nouvelle méthode pour colorer la graisse dans les tissus, Arch. Ital. de Biol., 1896, XXVI, S. 142.

neuerer Zeit viel gebrauchte Sudan III (Biebricher Scharlach) wurde in der botanischen Mikrochemie zuerst von Buscalioni[1]) benutzt zur Färbung von Harzen in Form einer alkoholischen Lösung (1 : 200). Der Farbstoff fand zum Fettnachweis in der tierischen Histologie Anwendung von Rosenthal[2]), wurde zur gleichen Zeit von Tunmann[3]) zur Differentialdiagnose von Harzen und Fetten bei den Sekretbehältern herangezogen. A. Meyer[4]) gebrauchte ihn zum Fettnachweis in Bakterien. Der Farbstoff kann in nachstehender Lösung angewandt werden: 0,1 g Sudan III, 10 g Alkohol, 10 g Glyzerin. Die Präparate bleiben auf 24 Stunden in der Farblösung, werden einige Stunden mit verdünntem Alkohol (50 %) ausgewaschen und in Glyzerin untersucht. Die Reaktion läßt sich auch unter Deckglas ausführen. Die Fette werden strohgelb bis rot (ebenso werden Harze, ätherische Öle, verkorkte und kutinisierte Membranen gefärbt). Sind feste Fette oder Fettsäurekristalle zugegen (Drogen, Kakaosamen), so tritt die Färbung nur sehr langsam ein. Schwaches Erwärmen bis zur teilweisen Schmelzung der Fettmassen beschleunigt die Farbstoffaufnahme. Nach Rieder[5]) und Handwerck[6]) färben sich reine Palmitin- und Stearinsäure (Kahlbaum) bei gewöhnlicher Temperatur nicht mit Sudan, sondern erst beim Schmelzen.

Gleichzeitig kam Scharlach R (Fettponceau) in Aufnahme. Dieser Farbstoff färbt in 15—30 Minuten und wird als gesättigte Lösung in 70 % Alkohol benutzt. Lagerheim[7]) empfahl ihn zum Nachweis fremder Fette in Schokoladen; bei tierischen Geweben wurde er von

[1]) L. Buscalioni, Nuovo reatt. p. l'istol. veg., Malpighia, 1898, XII und: Sudan III und seine Verwendung in der botanischen Mikrotechnik, Bot. Centralbl., 1898, LXXVI, S. 398.

[2]) W. Rosenthal, Verhandl. d. d. Patholog. Ges., München, 1899, II, S. 440.

[3]) O. Tunmann, Über die Sekretdrüsen, Berner Dissert., Leipzig 1900, S. 11.

[4]) A. Meyer, Notiz über das Verhalten der Sporen und Fetttropfen der Bakterien gegen Eau de Javelle und gegen Chloralhydrat, Centralbl. f. Bakteriol., I. Abt., 1901, XXIX, S. 809.

[5]) H. Rieder, Über die Verwendbarkeit d. Farbstoffes Sudan III in der klinischen Mikroskopie, Deutsch. Arch. f. klin. Med., 1898, LIX.

[6]) C. Handwerck, Beiträge z. Kenntn. vom Verhalten der Fettkörper zu Osmiumsäure und zu Sudan, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1898, XV, S. 177.

[7]) G. Lagerheim, Technische Mitteilungen, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1897, XIV, S. 350 und: Über mikroskopische Untersuchungen von Kakao und Schokolade, Svensk. Farm. Tidskr., 1902, VI, Nr. 9. Es wird Scharlach R, in Milchsäure gelöst, benutzt und bei der Unterscheidung fremder Fette im Kakao nach stattgehabtem Erhitzen der Erstarrungspunkt mit dem Polarisationsmikroskop beobachtet.

Michaelis[1]) und Herxheimer[2]) erprobt. Letzterer empfiehlt eine gesättigte Lösung in 70,0 absoluten Alkohol, 10,0 Wasser und 20,0 Natronlauge; die zerstörende Wirkung der Lauge wird durch den starken Alkohol aufgehalten. Bei pflanzlichen Objekten scheint diese Zusammensetzung noch nicht gebraucht zu sein. Sie müßte eine Aufhellung der Gewebe bewirken. Hingegen habe ich in mit Scharlach gefärbten Präparaten sehr kleine Tröpfchen Fett, die der Beobachtung leicht entgangen wären, durch nachträglichen Zusatz von Schwefelsäure sichtbar gemacht. Die rötlichen Fetttröpfchen flossen zu blauen Kugeln zusammen, Scharlach löst sich nämlich in Schwefelsäure mit blauer Farbe. Die übrigen Farbstoffe haben sich nicht so allgemein eingebürgert, wie die eben genannten. Einige färben nicht nur Fette und ätherische Öle, Harze, verkorkte und kutinisierte Membranen, sondern auch noch andere Zellinhalte, zuweilen Tonerdekörper, selbst Zellkerne und Nukleinsubstanzen. Anderseits werden nicht alle Fette gefärbt. Überdies sind in vielen Fällen die erzielten Färbungen nicht genügend scharf und lassen verschiedene Deutungen und somit Verwechslungen zu. Hierher gehören Cyanin, Chlorophyllgrün, Buttergelb, Fettblau, Meyers Gelb, Brasilin, Alizarin u. a. Trotzdem wird man diese Farben in speziellen Fällen mit Erfolg benutzen können. Das neuerdings von Hell & Co. in Troppau in den Handel gebrachte Chlorophyllum bisdepuratum (eine alkoholische Lösung) erwies sich bei einigen Versuchen recht brauchbar. Cyanin, von Ranvier[3]) zum Fettnachweis eingeführt, wird in 50% alkoholischer Lösung benutzt. Die Lösung hält sich einige Zeit in braunem Glase. Die Schnitte kommen auf 24 Stunden in die Cyaninlösung (vor Licht geschützt!), werden mit 50% Alkohol ausgewaschen und in Glyzerin untersucht. Die Öltropfen im Mesophyll der Blätter werden nur grünlich, anderseits nach Hartwich und Uhlmann (s. u.) die Zellkerne im Perikarp von „Olea europaea schön blau, das Öl nur grünlich". Hierzu muß bemerkt werden, daß selbst eine dreitägige Einwirkung der Cyaninlösung bessere Resultate nicht hervorruft. Von Orlean (Extr. Orlean. spir. spiss. Merck in Essigsäure gelöst) werden Fette gelblich gefärbt (Sonntag)[4]). Über weitere Fettfarbstoffe s. Harze und unter Korkmembran.

---

[1]) L. Michaelis, Deutsch. Med. Wochenschr., 1901, XXVII, Ref. in Ztschr. f. wiss. Mikr., 1901, XVIII, S. 313.

[2]) G. Herxheimer, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1902, XIX, S. 66. Dieser Autor empfiehlt ferner Indophenol in gesättigter Lösung in 70% Alkohol (Blaufärbung).

[3]) Ranvier, Technisches Lehrbuch der Histologie, Leipzig 1888, S. 97.

[4]) P. Sonntag, Der Orlean, ein neues Mittel zur Färbung der verkorkten und kutikularisierten Membranen, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1907, XXIV, S. 21.

Vielfache Anwendung findet 1 % Osmiumsäure, welche viele Fette braun bis schwarz färbt (infolge Reduktion). Gelindes Erwärmen beschleunigt die Reaktion. Die Färbung kann in kurzer Zeit durch Wasserstoffsuperoxyd und in einigen Stunden, wie Flemming[1]) zeigte, durch Terpentinöl, Xyol, Kreosot und Äther wieder aufgehoben werden. Äther kann aus praktischen Gründen hierzu nicht empfohlen werden. Nun reagiert Osmiumsäure in gleicher Weise mit ätherischen Ölen, Harzen und Gerbstoffen. Letztere kann man mit Gerbstoffreagentien identifizieren, auch oft durch Mazerieren und Aufkochen mit Wasser entfernen. Doch sind nicht alle Körper, die wir unter der Bezeichnung „Gerbstoffe“ vereinen, wasserlöslich. Es empfiehlt sich die mit Osmiumsäure gefärbten Schnitte mit Vanillinsalzsäure nachzubehandeln. Dann werden diejenigen Gerbstoffe, die Phloroglucinderivate sind, leuchtend rot. Schließlich kann man vor der Behandlung mit Osmiumsäure. die Gerbstoffe mit Eau de Javelle zerstören. Die Fette werden dadurch nicht angegriffen und reagieren mit Osmiumsäure.

Die ätherischen Öle hat man aus den mit Osmiumsäure behandelten Präparaten durch Kochen der Schnitte mit Wasser entfernen wollen, ein Verfahren, das nach meinen Erfahrungen zwar häufig, aber nicht stets zum Ziele führt. Bei Drogen und getrockneten Pflanzen ist die Methode infolge teilweiser Verharzung der ätherischen Öle nicht zu benutzen und diese Verharzung erfolgt auch an lebendem Material sowohl beim Aufkochen mit Wasser, mehr noch bei längerer Aufbewahrung der Schnitte im Trockenschrank bei 100° und darüber. Zudem imprägnieren die verharzenden Terpene hierbei gerade die Fettmassen. Hingegen haben sich Wasserdämpfe zur Entfernung der ätherischen Öle (s. d.) aus Schnitten bewährt.

So ergibt sich denn folgender Gang: Die Schnitte werden nach der Behandlung mit Eau de Javelle (zur Entfernung der Gerbstoffe) Wasserdämpfen ausgesetzt und dann erst mit Osmiumsäure behandelt. Die Methode hat zur Voraussetzung Schnitte frischen (lebenden) Materials. Liegen Gemische von harzigen Balsamen, Schleimen oder ätherischen Ölen mit Fetten vor, so gestalten sich die Verhältnisse schwieriger. Doch geben in solchen Fällen die Lösungsverhältnisse an Vergleichspräparaten sowie die mikroskopischen Vergleiche, die eventuell durch genaue Zeichnungen mit dem Zeichenapparat zu unterstützen sind, Aufschluß.

Der Wert der Osmium-Reaktion auf Fette erfährt eine Einschränkung durch die Ergebnisse Altmanns, aus denen hervorgeht,

[1]) W. Flemming, Weiteres über die Entfärbung osmierten Fettes in Terpentin und anderen Substanzen, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1889, VI, S. 178.

daß nicht alle Fette mit Osmiumsäure reagieren[1]). Nur freie Ölsäure und Olein wird von Osmiumsäure geschwärzt. Nachfolgende Behandlung mit Alkohol kann zur Unterscheidung beider Substanzen dienen. Mit Osmiumsäure behandelte Ölsäure löst sich in Alkohol, mit Osmiumsäure behandeltes Olein ist unlöslich in Alkohol. Anderseits reagiert Osmiumsäure nicht mit Stearinsäure und mit Palmitinsäure und ihren Triglyzeriden. Nun kommen aber in den Pflanzenfetten Gemische der Glyzeride verschiedener Fettsäuren vor, so daß wir über die Wirkung des Reagens folgendes sagen können: Jedes Fett, das sich in den Geweben direkt mit Osmiumsäure schwärzt, besteht zum größten Teile aus Ölsäure, während die Fette, welche nur gelb oder braun werden, zumeist aus Palmitin- oder Stearinsäure bestehen. Die schwache gelbe bis braune Färbung wird durch geringe Mengen an Ölsäure bewirkt. Derartige Fette werden durch Osmiumsäure schlecht fixiert und lösen sich infolgedessen leicht in ätherischen Ölen. Das braun gefärbte Fett kann bei Einwirkung von schwachem Alkohol eine schwarze Farbe annehmen.

Hiermit ist gleichzeitig ein reaktioneller Hinweis auf Lezithine[2]) gegeben (P. Mulon[3])), denn diese sind stets arm an Ölsäure, werden also durch Osmiumsäure schlecht fixiert, nur braun gefärbt, erst bei nachfolgendem Alkoholzusatz schwarz und von ätherischen Ölen gelöst Dadurch finden die Angaben von Neubauer[4]) Bestätigung, nach dem Osmiumsäure nur das Vorhandensein einer doppelten Bindung der C- und CH-Atome anzeigt. Tritt also bei Lezithin einmal Schwärzung mit Osmium ein, so ist dasselbe wahrscheinlich in Neurin übergegangen. Überdies soll sich Lezithin im Gegensatz zu Fett nach Behandlung mit Chromatbeizen nicht mehr mit Osmiumsäure schwärzen[5]). Lezithine lösen sich (im Gegensatz zu den Fetten) nicht in Azeton (C. Deflandre, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1904, XXI, S. 47).

---

[1]) R. Altmann, Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen, I. Aufl., Leipzig 1890, S. 106 u. II. Aufl., 1894, S. 116.

[2]) Lezithine sind fettartige Substanzen, die beim Kochen mit verdünnten Säuren oder Basen, sowie nach längerer Einwirkung von Oxalsäure in Fettsäuren, Glyzerinphosphorsäure und Cholin zerfallen. Zum Nachweis werden die Schnitte mit Formalin gehärtet, mit Alaun gebeizt, mit Alkohol und Azeton gewaschen und schließlich mit Haematoxylin, Gentianaviolett oder Methylgrün gefärbt. Auf unserem Gebiete liegen hierüber eingehende Erfahrungen nicht vor.

[3]) P. Mulon, Action de l'acide osmique sur les graisses, Bibliogr. anat., 1904, XIII, S. 208.

[4]) Neubauer, Verh. d. 72. Vers. deutsch. Naturf. u. Ärzte, Karlsbad.

[5]) Colassak, zit. bei Czapek, Biochemie I, S. 105.

Die Verseifungsmethode (Molisch)[1]) steht beim Nachweis der Fette an erster Stelle. Vielfach wird in der Literatur angegeben, daß es mit ihrer Hilfe gelingt, sämtliche Pflanzenfette im Gewebe mikrochemisch nachweisen zu können. Demgegenüber haben langjährige Untersuchungen immer wieder von neuem dargetan, daß die Methode beim Nachweis in der Zelle und bei kleinen Mengen zuweilen im Stich läßt, auch wenn das Reagens genügend lange eingewirkt hatte. Oft kommt man dann, wenn durchführbar, durch Isolierung der Fetttropfen zum Ziele. Die Reaktion wird mit Kalilauge-Ammoniak ausgeführt. Ätzkali wird zur Entfernung des Karbonats oberflächlich mit destilliertem Wasser abgespült, dann wird eine konzentrierte wässerige Lösung bereitet, die noch etwas Ätzkali ungelöst enthält. Diese Lösung wird mit dem gleichen Volumen 20% Ammoniakflüssigkeit gemischt. Das Reagens hält sich im braunen Glasstöpselglase einige Zeit. Ein Jahr alte Lösungen waren stets zu schwach geworden. Die Präparate werden trocken auf den Objektträger gelegt, mit einigen Tropfen Lauge bedeckt und das Deckglas aufgelegt. Da nun erfahrungsgemäß die Verseifung erst nach mehreren Stunden deutlich sichtbare Erfolge verursacht, so ist es ratsam, das Deckglas mit Wachs zu umranden; dadurch wird ein Verdunsten des Reagens verhindert und Karbonatausscheidungen, die zuweilen recht störend wirken können, werden möglichst vermieden.

Es ist nun unbedingtes Erfordernis, die Präparate einer Dauerbeobachtung von mehreren Tagen zu unterziehen. Viele irrtümliche Literaturangaben sind nach eigenen Befunden nur dadurch zu erklären, daß die Präparate nicht nach 1 bis 2 Tagen gründlich durchmustert wurden. Des weiteren ist polarisiertes Licht unbedingt erforderlich. Wir können an dem Öle eines Präparates verschiedene Erscheinungen feststellen (Elaeis, Amygdalus, Rizinus, Coffea u. a. wurden eingehend mit gleichem Ergebnis untersucht). Im gewöhnlichen Lichte sehen wir zunächst, daß die Tropfen zum Teil ihr Lichtbrechungsvermögen etwas einbüßen, zum Teil ein etwas schaumiges Aussehen erhalten. Alsdann erscheinen an der Peripherie der Tropfen feine hautartige Anhängsel, die man im Anfange ihrer Entstehung leicht für plasmatische Reste halten kann. Sie färben sich aber nicht mit Jod und der weitere Verfolg lehrt, daß in ihnen Anfangsstadien der Seifenkristalle vorliegen. Nach 1 Tage sind die Seifen deutlich ausgebildet; sie leuchten bei gekreuzten Nicols im allgemeinen nur wenig auf und sind dadurch von den lebhaft und farbig aufleuchtenden Kali-

[1]) H. Molisch, Grundriß einer Histochemie der pflanzlichen Genußmittel, Jena 1891, S. 10.

kristallen leicht zu unterscheiden. Einige Tropfen sind ganz in Kristalle übergegangen, andere erscheinen ganz hyalin und ihr Umriß ist durch einen Kranz von Seifennadeln gekennzeichnet. Die zentrale Partie weiterer Tropfen besitzt noch starkes Lichtbrechungsvermögen und nur am Rande sind Kristalle. Die gebildete Seife hat den inneren Teil des Tropfens vor der weiteren Wirkung der Lauge geschützt. Hier und da sind selbst bei völlig in der Ruhe belassenen Präparaten die Seifenkristalle durch Strömungen von den Tropfen fort und an fettfreie Stellen des Präparates geschwemmt (Fig. 44). Außerdem finden wir und zwar an dem gleichen Präparate Tropfen, die durch einen mehr oder weniger deutlichen Kreis eine Schale oder einen Hof erkennen lassen. Diese Tropfen zeigen in polarisiertem Lichte das bekannte dunkle Kreuz (besonders charakteristisch!), wodurch bei schwacher Vergrößerung leicht die Anwesenheit von Stärke vorgetäuscht wird. Doch ist eine Verwechslung mit Stärkekörnern bei Dauerbeobachtung ausgeschlossen (Wirkung der Lauge). Nach 4 bis 5 Tagen wird man nach Tropfen mit dem dunklen Kreuz vergeblich suchen. Sie haben inzwischen nur selten Seifenkristalle gebildet, sondern zeigen in den meisten Fällen am Rande Myelinformen (s. S. 164), die oft nur an einer Seite des Tropfens ausgebildet sind. Die Größe der Tropfen ist auf die verschiedenen Erscheinungen nur von geringem Einfluß. Da die Erscheinungen bei allen Objekten in gleicher Weise auftreten, so kann auch die chemische Zusammensetzung der Öle ebenfalls nicht die Ursache sein, weshalb nur bei einzelnen Tropfen Myelinbildung erfolgt.

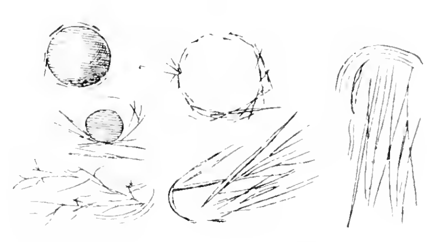


Fig. 44. Elaeis guineensis, Öltropfen, 20 Stunden in Kalilauge-Ammoniak, die verschiedenen Stadien der Verseifung zeigend (Tunmann).

Nun gibt allerdings Kalilauge-Ammoniak auch mit anderen Substanzen kristallinische Reaktionsprodukte. Diese sind jedoch über das ganze Gesichtsfeld verteilt (Alkaloide) oder von gänzlich abweichenden Formen (Weinsäure). Überdies treten die Verseifungsprodukte erst nach mehreren Stunden, oft erst nach 1 Tage, klar hervor, während Alkaloide u. a. mit der starken Lauge schon in sehr kurzer Zeit reagieren.

Hartwich und Uhlmann[1]) haben den Verseifungsprozeß bei folgenden chemisch reinen Ölen verfolgt: Oliven-, Mandel-, Pfirsichkern-, Arachis-, Lein-, Mohn- und Rizinusöl und beschreiben die Produkte, die mit der Lauge sowie mit

[1]) C. Hartwich und W. Uhlmann, Über den Nachweis fetter Öle durch mikrochemische Verseifung, Arch. d. Pharm., 1903, CCXLI, S. 111.

$^1/_2$ und $^1/_3$ verdünnter Lauge entstehen. In gleicher Weise untersuchten sie freie Ölsäuren. Palmitin-, Stearin-, Laurinsäure geben kurze Nadeln, Arachinsäure bildet dicke kurze Nadeln und Platten, Ölsäure kurze Nadeln und Sphärite.

Myelinbildung. Als Myelinformen (Virchow) bezeichnet man durch Einwirkung von Alkalien aus Fetttropfen entstandene, gewissermaßen herausgeschleuderte Gebilde, die die verschiedensten Formen besitzen (vergl. Fig. 45), schließlich Kugeln und Kränze abschnüren, im polarisierten Lichte aufleuchten und zu den flüssigen Kristallen zählen (Adami und Aschoff). Nach dem Eintrocknen resultieren sehr kleine, unvollkommen kristallinische Gebilde. Früher schrieb man die Fähigkeit, Myelinformen zu bilden, ausschließlich dem Cholesterin zu (Beneke), was von Köhler bezweifelt wurde. Nestler[1]) führt die Myelinbildung

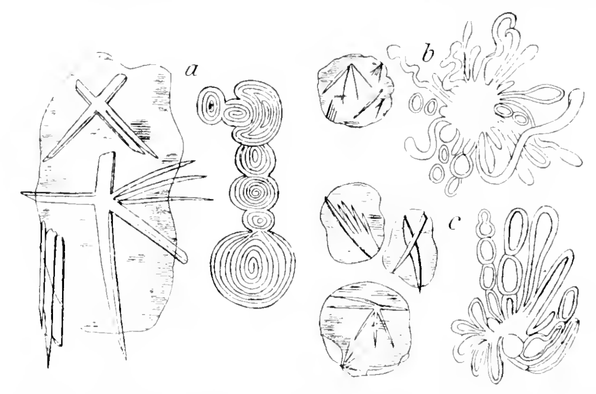


Fig. 45. Sublimationstropfen mit Fettsäurekristallen nebst zugehörigen Myelinformen, *a)* von Areca catechu, *b)* von Illicium religiosum, *c)* von Elaeis guineensis (Tunmann).

des Sekretes von Capsicum annuum auf Ölsäure zurück und Senft[2]) kam zu dem Ergebnis: „ohne Fettsäuren keine Myelinformen“; er erhielt sie wenigstens mit reiner Öl-, Leinöl-, Eruka-, Kaprin-, Kaprylsäure.

Die Myelinbildung innerhalb der Zelle gelingt nicht immer und nicht gut, die schönen Formen können in der engen Zelle gar nicht zur Entwicklung gelangen. Die Fette müssen isoliert werden. Vielfach (bei zarten Objekten, niederen Pflanzen, Sekretdrüsen) genügt ein Druck auf das Deckglas, um die Tropfen in Freiheit zu setzen[3]), bei stärkeren

[1]) A. Nestler, Myelin- und Eiweißkristalle in der Frucht von Capsicum annuum, Sitzber. Wien. Akad., 1906, CXV, Abt. 1, S. 477.

[2]) Em. Senft, Über die Myelinformen bildende Substanz im Gingkosamen, Pharm. Post, 1907, XL, Sep.

[3]) A. Nestler, Das Sekret der Drüsenhaare der Gattung Cypripedium, Ber. deutsch. bot. Ges., 1908, XXV, S. 554.

Präparaten ein Zerzupfen, bei Gegenwart größerer Mengen ein Herausheben mit der Nadel. Auf die isolierte Substanz läßt man 1—10% Ammoniak oder Kalilauge einwirken. Selbst saures phosphorsaures Natrium kann herangezogen werden (Senft). In anderen Fällen müssen starke Laugen benutzt werden (Salvia glutinosa), besonders bei Gemischen; die Konzentration der Lauge muß daher von Fall zu Fall modifiziert werden. Die Myelinformen entstehen bald, oft sofort, sind mehrere Stunden beständig und werden beim Eintrocknen der Flüssigkeit undeutlich. Um sie einige Tage zu erhalten, werden die Reaktionen im ausgehöhlten Objektträger vorgenommen und die Deckgläser mit Vaselin luftdicht verschlossen. Die Myelinformen speichern Anilinfarbstoffe: vorteilhaft gebraucht man Ammoniak, das mit Safranin, Methylenblau u. a. gefärbt ist. Bei Zusatz von Essigsäure oder von konz. Kochsalzlösung ziehen sich die Formen ein oder ballen sich zu Klumpen und Kugeln zusammen. Nun konnte aber Nestler bei Cocos nucifera und bei Elaeis guineensis weder mit den Präparaten noch mit dem Rückstand des Ätherauszuges Myelinformen erzielen. In derartigen Fällen muß man zur Sublimation greifen (Tunmann)[1]). Wie Fig. 45 zeigt, erhält man mit Schnitten von Elaëis, Cocos, Areca catechu, Illicium u. a. Sublimate, die aus Tropfen bestehen, die bei gekreuzten Nicols aufleuchten und aus denen sich nach wenigen Minuten schön ausgebildete Kristalle (Fettsäuren) ausscheiden[2]). Zuweilen erstarrt der ganze Tropfen zu einer kristallinischen Masse. Nun läßt sich feststellen, daß die Myelinformen in den Sublimaten zuerst aus den flüssig gebliebenen Anteilen der Tropfen entstehen und daß die Kristalle weit schwieriger zur Myelinbildung schreiten. Bedeckt man das Präparat mit dem Deckglase, dann lösen sich bei mehrfachem Durchsaugen von Petroläther die flüssigen Anteile auf, während die Kristalle nicht oder doch erst nach längerer Zeit etwas angegriffen werden. Die flüssigen Anteile stellen demnach die flüssigen unge-

---

[1]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie der Arekanuß, Pharm. Post, 1911, XLIV, S. 703 und: Zur Mikrochemie und Mikrosublimation einiger Methanderivate, Apoth. Ztg., 1912, XXVI, S 983.

[2]) Abscheidungen von Kristallen in „fettartigen" Tropfen der Sublimate dürfen nicht ohne weiteres als Fettsäuren gedeutet werden, da sich Alkaloide an gleicher Stelle abscheiden. Die Fettsäurekristalle zeichnen sich jedoch durch ihre Größe, ihre typische Gestalt und ihr reaktionelles Verhalten aus. In den sublimierten Tropfen von Linum, Theobroma, Rizinus, Amygdalus (Schnitte der Samen) scheiden sich Kristalle meist nicht oder erst nach längerer Zeit aus; hingegen erstarren die Fettsäuren im Sublimat des Endosperms von Anamirta paniculata sofort kristallinisch (für diese Kristalle konnte L. Frank, Zeitschr. Nahr.- u. Genm., 1903, VI, S. 888, keine Deutung beibringen).

sättigten Fettsäuren dar, bei ihnen erfolgt die Myelinbildung weit leichter als bei den kristallinischen Fettsäuren. Bei weiteren Untersuchungen wird auf Phytosterinen zu achten sein.

Wo mithin Myelinbildung an Fetten in den Präparaten oder im isolierten Zustande nicht gelingt, da greifen wir zur Sublimation. In den Sublimationstropfen gelingt die Myelinbildung stets, wobei es ohne Bedeutung ist, ob sich die Fettsäuren kristallinisch abscheiden oder nicht. Bei der Sublimation hat nicht nur gewissermaßen eine Reinigung der Fette von fremden Beimischungen, sondern vor allem eine mehr oder weniger vollständige Abspaltung von Fettsäuren stattgefunden, so daß die Alkalien leichter auf die für die Myelinbildung allein in Betracht kommenden Bestandteile der Fette, auf die Fettsäuren, einwirken können.

Allerdings geben nach Czapek[1]) auch konz. Tanninlösungen Myelingebilde. Gerbstoffe können (Areca catechu) sowohl in den ersten rein weißen als auch in den späteren, gelblichen Sublimaten zugegen sein. Sie werden durch Eisenchlorid braunschwarz, gehen beim Erwärmen in tiefschwarze Tropfen über. Beim Erwärmen werden die Fettsäuren geschmolzen, scheiden sich aber beim Erkalten (neben den schwarzen Gerbstofftropfen) wieder farblos, ev. in kristallinischem Zustande, ab. Eine Verwechslung von Gerbstoff und Fettsäuren ist in den Sublimaten unmöglich.

Während wir mit Verseifung und Myelinbildung die Fettsäuren sicher nachweisen können, ev. erst nach erfolgter Reinigung mittels Mikrosublimation, gelingt der Nachweis des **Glyzerins** in Schnitten nicht. Bei der Mikrosublimation tritt bei höherer Temperatur zuweilen Akroleingeruch auf: es hat eine Zersetzung stattgefunden. Man erhält dann im Sublimat (falls die Dämpfe nicht gänzlich entwichen sind) mit Anilin einen amorphen braunen Niederschlag und kann auch nach Behrens[2]) prüfen mit einer wässerigen Lösung von salzsaurem p-Nitrophenylhydrazin, die mit einem Tropfen Essigsäure angesäuert ist (orangefarbene Sternchen, die aus bis 150 μ langen Nadeln zusammengesetzt sind). Auch Blaufärbung mit Piperidin und Nitroprussidnatrium (Lewin) zeigt Akrolein an. In Sublimaten, in denen andere, uns unbekannte Körper zugegen sind, ist diese Reaktion aber ebensowenig beweisend, wie die in der Kälte eintretende Reduktion mit ammoniakalischer Silbernitratlösung. Zum Nachweis von Glyzerin im Gewebe geben reifende Samen

[1]) Fr. Czapek, Über Fällungsreaktionen in lebenden Pflanzenzellen und einige Anwendungen derselben, Ber. deutsch. bot. Ges., 1910, XXVII, S. 147.

[2]) H. Behrens, p-Nitrophenylhydrazin als mikrochemisches Reagens, Chem.-Ztg., 1903, XXVII, S. 1105.

das beste Material. Wässerige Lösungen von Glyzerin versetzt Behrens[1]) im Proberöhrchen mit etwas langfaserigem Asbest und Kaliumhydrosulfat, erhitzt und stellt den Akroleingeruch fest.

In konz. Schwefelsäure sind Fette und ätherische Öle unlöslich. Bei Abwesenheit letzterer kann man durch Schwefelsäure die Präparate zerstören, wobei die Fetttröpfchen hervortreten und zu größeren Tropfen ineinanderfließen. Bei Zusatz von Schwefelsäure und Osmiumsäure nehmen die sich ansammelnden Tropfen braunschwarze Färbung an. Die Reaktion läßt sich zum Nachweis sehr kleiner Fettmengen verwenden. Doch muß die Fettnatur durch andere Reagentien sichergestellt sein. So kann man Pollen und Sporen mit Schwefelsäure-Osmiumsäure behandeln und durch einen Druck auf das Deckglas die Körner zum Platzen und das Fett zur Anschauung bringen.

Salzsäure in Dampfform wurde von Mesnard[2]) zur Differentialdiagnose von ätherischem Öle und Fett herangezogen (Ausführung der Reaktion s. äth. Öle). Die Schnitte werden in stark zuckerhaltigem Glyzerin den Dämpfen einer konz. Salzsäure ausgesetzt, ätherische Öle verschwinden bald. Dauert nun die Einwirkung der Salzsäure-Dämpfe 1—$1^1/_2$ Tage, dann ist der gesamte Zellinhalt bis auf das Fett zerstört. Das Fett hat sich in einigen Tropfen angesammelt. Kurze Einwirkung (2 Sekunden) von Joddämpfen färbt die Tropfen goldgelb, so daß sie sich sehr scharf abheben. Wird nun der Durchmesser der Tropfen gemessen, dann läßt sich leicht die im Schnitte enthaltene Fettmenge berechnen. Salpetersäure, salpetrige Säure und ihre Dämpfe können gleichfalls benutzt werden. Bei diesen Reaktionen mit Säuren, sowie bei einer Anzahl weiterer Reaktionen treten Färbungen ein, die aber sämtlich nur mit Schnitten der Samen und anderer fettreicher Gewebe ausführbar sind. So wird, um nur einige Beispiele anzuführen, mit rauchender Salpetersäure das Fett der bitteren Mandel indigoblau, von Pfirsichen orangegelb, von Kriechenfrüchten blaugrün, von Aprikosen gelb[3]). Bei diesen Fetten sind die Farben auch mikroskopisch in den Schnitten gut zu erkennen; ob dies auch bei anderen Reaktionen der Fall ist (molybdänschwefelsaures Natrium, aromatische Aldehyde mit Salzsäure, Formalinschwefelsäure u. a.) muß noch näher ermittelt werden.

Lehrreich sind die Versuche Fischlers[4]) im tierischen Gewebe den Fetten

[1]) H. Behrens, Beiträge zur mikrochem. Analyse organischer Verbindungen I, Chem.-Ztg., 1912, XXVI, S. 1125.

[2]) E. Mesnard, Recherches sur la localisation des huiles grasses dans la germination des graines, Compt. rend., 1893, CXVI, S. 111.

[3]) H. V. Rosendahl, Svensk. Farm. Tidskr., Jan. 1907, XI.

[4]) F. Fischler, Über die Unterscheidung von Neutralfetten, Fettsäuren und Seifen in Geweben, Zentralbl. f. Pathol. u. pathol. Anatom., 1904, XV, S. 913.

mikrochemisch nachzugehen und den Auf- und Abbau von Fett zu verfolgen. Die Spaltungsprodukte (freie Fettsäuren, fettsaure Salze, Seifen) müssen dann an Ort und Stelle nachgewiesen werden. Die Gewebe werden mit reiner konzentrierter Kupferazetatlösung behandelt. Die freien Fettsäuren bilden palmitin-, stearin- oder oleïnsaure Kupfersalze, die mit Weigertschem Haematoxylin Lacke bilden, welche in Weigertscher Differenzierungsflüssigkeit[1]) fast unlöslich sind. Um die Seifen (Kalium- und Natriumsalz der Fettsäuren) nachzuweisen, sind diese erst in unlösliche fettsaure Salze überzuführen, da sonst die Seifen leicht in die Fixierungsflüssigkeit übergehen. Die Überführung wird durch salizylsaures Kalzium bewirkt. Die auf Seifen zu untersuchenden Gewebestücke werden mit 10 % Formollösung fixiert, der bis zur Sättigung salizylsaures Kalzium zugesetzt ist. Darauf folgt wiederum Verkupferung mit Kupferazetat und Kupferlackbildung mit Haematoxylin. Vergleichspräparate zeigen nun, ob neben freien Fettsäuren noch Seifen im Gewebe zugegen sind.

Zum Nachweis der Fette in Bakterien (B. tumescens) benutzt A. Meyer[2]) Sudan III (rot) und Dimethylamidoazobenzol (gelb). Letzterer Farbstoff wurde schon von Michaelis gebraucht, Kohl färbte die Fette der Cyanophyceen damit. Gute Erfolge geben Doppelfärbungen mit Methylenblau einerseits und den beiden Farbstoffen anderseits. Von Eau de Javelle werden die Fetttropfen schwer angegriffen, lösen sich hingegen leicht in starker Chloralhydratlösung (5 g auf 2 g Wasser). Nach Unna leistet bei Bakterienfetten Osmiumsäure gute Dienste und Czaplewski[3]) führt Scharlach R., Alkannin und Cyanin ebenfalls als brauchbar an. Als neue Methode führte A. Meyer[4]) Färbung mit Naphtholblau ein. Das Reagens muß stets frisch bereitet werden aus einigen Tropfen einer filtrierten wässerigen 1 % Lösung von Dimethylparamethylendiamin und gleichviel Tropfen von α-Naphthol in 1 % Sodalösung.

In den höheren Pilzen sammelt sich das Fett oft in großen Tropfen an, so in den Sklerotien (von Claviceps purpurea) und in Conidien. Myelinbildung gelingt in den Hyphen mit 10—15 % Ammoniak, Verseifung selbst außerhalb des Gewebes schlecht und nicht immer, besser im Sublimat, in dem sich auch Fettsäurekristalle finden.

Über das Fett der Fettzellen der braunen Parmelien, das Zukal als Reservestoff, Fünfstück als Exkret betrachtet, hat Rosendahl[5])

[1]) Ferricyankalium 2,5, Borax 2,0, Wasser 100.

[2]) A. Meyer, Notiz über das Verhalten der Sporen und Fetttropfen der Bakterien gegen Eau de Javelle und gegen Chloralhydratlösung, Centralbl. f. Bakt., 1901, Abt. 1, XXIX, S. 809.

[3]) Czaplewski, Ztschr. f. wiss. Mikr. 1901, XVIII, S. 495.

[4]) A. Meyer, Naphtholblau als Reagens für Bakterienfett, Centralbl. f. Bakt., 1904, Abt. I, XXXIV, S. 578.

[5]) H. V. Rosendahl, Vergleichend-anatomische Untersuch. über die braunen Parmelien, Nov. act. Leop.-Car., 1907, LXXXVII, S. 401.

eingehende Angaben gemacht. Nach Bachmann[1]) kommen Ölzellen nicht nur bei Kalkflechten, sondern auch bei allen granitbewohnenden Flechten vor. Ihr Inhalt wird mit Alkanna rot. Besser eignet sich Osmiumsäure, da die Färbung selbst bei kleinsten Tropfen bestehen bleiben soll. Alkannatinktur durchdringt zudem die Zellwände nur sehr langsam. Bei Sphyridium byssoides tritt zunächst ein eiweißartiger Stoff auf und erst im Alter ist „ein dem Eiweiß eingebettetes Fettkügelchen zu erkennen" (a. a. O. S. 12). Bachmann berechnet auch die Anzahl der Ölzellen bei einigen Granitflechten.

In Acetabularien (Sporen, Schirmen) kommen rote Pigmenttröpfchen vor (Woronin, de Bary, Leitgeb)[2]), die sich beim Einlegen der Algen in Alkohol teils in Körnchen, teils kristallinisch (Blättchen, Stäbchen, oft zu Aggregaten vereinigt) abscheiden. Sie lösen sich in Alkohol und in Äther, werden von Schwefelsäure vorübergehend blau gefärbt und durch Kalilauge beim Erwärmen in rote Tröpfchen übergeführt und für eine fettartige Substanz gehalten, die den Farbstoff führt. In Peridineen hat Schütt[3]) Fettplatten (Osmiumsäure) angetroffen, die ebenfalls weiter zu studieren wären.

Bei den höheren Pflanzen gibt es noch viele „Fett- und Ölkörper", deren Studium noch nicht abgeschlossen ist. Hierher zählen die von Radlkofer[4]) Monteverde[5]), Solereder[6]), Zimmermann[7]) beschriebenen kugligen Gebilde, die in den Blättern (Mesophyll) vieler höherer Pflanzen beobachtet wurden (Cinchoneen, Combretaceen, Cordiaceen, Gaertneraceen, Gramineen, Rubiaceen, Sapindaceen, Sapotaceen u. a.). Die Gebilde liegen oft in der Einzahl in der Zelle, erreichen bisweilen Chloroplastengröße (2—15 μ), sind meist isotrop, vereinzelt doppelbrechend. Die Doppelbrechung verschwindet bei Gramineen, wenn man die Präparate in Wasser auf 50—55° C erwärmt. Sie geben

[1]) E. Bachmann, Die Rhizoidenzone granitbewohnender Flechten, Jahrb. f. wiss. Bot., 1907, XLIV, S. 1. Vergl. auch Stahlecker, Untersuchungen über Thallusbildung und Thallusbau in ihren Beziehungen zum Substrat bei siliciseden Flechten, Dissertation, Stuttgart 1905.

[2]) H. Leitgeb, Die Inkrustation der Membran von Acetabularia, Sitzber. Wiener Akad., 1887, XCVI 1, S. 15.

[3]) F. Schütt, Sitzber. Berl. Ak., 1892, S. 377.

[4]) L. Radlkofer, Z. Klärung v. Theophrasta u. d. Theophrasteen, Sitzb. Münchener Akad., math.-phys. Klasse, 1889, XIX, S. 221.

[5]) N. A. Monteverde, Üb. d. Ablagerung von Kalzium- u Magnesiumoxalat in d. Pflanze, Bot. Zentralbl., 1885, XLIII, S. 327.

[6]) H. Solereder, Studien über d. Tribus d. Gaertnereen, Ber. d. bot. Ges., 1890, VIII, S. 71.

[7]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik 1892, S. 206.

Fettreaktionen, mit dem Verseifungsverfahren aber keine Seifenkristalle (Zimmermann). Auch in ihren Lösungsverhältnissen zeigen die Tropfen, selbst bei nahestehenden Pflanzen, ein verschiedenes Verhalten. Die Öltropfen der Nadeln von Abies sibirica lösen sich leicht in wässeriger Chloralhydratlösung, die in Taxus baccata sind nach Rywosch[1]) darin unlöslich. Für die Verschiedenheit der Bildungen spricht ferner der Befund, daß die Tropfen von Abies durch Kochen mit Wasser vertrieben werden können, trotzdem sie bei der Verseifung Seifenkristalle geben, die von Taxus aber nicht. Ferner fand Monteverde in Gramineen ölartige Tropfen, die hauptsächlich aus Harz bestehen sollen (?), trotzdem sie sich nach seiner Angabe mit Alkanna nicht färben. In all diesen Bildungen liegen jedenfalls Gemische verschiedener Köper mit wechselnden Mengen fettartiger Anteile vor.

In den Chromatophoren ziemlich verbreitet sind kleine stark lichtbrechende Tröpfchen, die gewöhnlich als Öltropfen bezeichnet werden. Ihr reaktionelles Verhalten weist teils auf Fette, teils auf ätherisches Öl hin, ja es ist nicht ausgeschlossen, daß wir in diesen Tröpfchen weder Fette noch ätherische Öle vor uns haben, sondern Substanzen unbekannter Natur (Aldehyde?). Vielfach liegen in den Tropfen keine reine Substanzen, kein reines Fett u. dergl., vor, sondern Gemische verschiedener Körper. Darauf deutet bereits ihr Verhalten gegen Chloralhydratlösung hin, in der sie teils leicht, teils schwer löslich sind. In Wasser und Essigsäure sind sie unlöslich, hingegen leicht löslich in Äther und Alkohol (selbst in verdünntem). Sie speichern Fettfarbstoffe und bräunen sich langsam mit Osmiumsäure. Die Tropfen in den Chromatophoren alter Blätter führen auch Zersetzungsprodukte des Chlorophyllfarbstoffes.

Die von den älteren Autoren als Bläschen angesprochenen, bis 50 μ großen Gebilde im Milchsaft der Blätter von Musa chinensis, die Trécul[2]) für Kautschuk hält, sind nach Molisch[3]) Fett. Sie sind teils dünnflüssig, teils von zäher Konsistenz. Letztere sollen einen deutlichen Kern, konzentrische Schichtung und eine Membran zeigen, also kristallinischer Natur sein. Sie schrumpfen in Alkohol ohne zu verschwinden, lösen sich leicht in Chloroform, Äther, Schwefelkohlenstoff, Benzol, färben sich mit Osmiumsäure (schwarz) und mit Alkanna-

[1]) S. Rywosch, In grünen Zellen vorkommendes Öl und seine Beziehung zur Herbstfärbung, Ber. d. bot. Ges., 1897, XV, S. 199.

[2]) A. Trécul, Des vaisseaux propres et du tannin dans les Musacées, Ann. d. sc. nat., 1867, 5. Sér. VIII, S. 283.

[3]) H. Molisch, Über Zellkerne besonderer Art, Bot.-Ztg., 1899, LVII, S. 177.

tinktur (rot). Über die Verseifungsergebnisse berichtet Molisch nicht. Auch A. Meyer (Chlorophyllkorn) kommt auf die Natur der „Öltropfen" der Musaceen zu sprechen: da sie sich leicht im Weingeist, Chloralhydrat und Äther lösen, so scheinen sie keine Fette zu sein.

Das im Innern der Gewebe auftretende sog. Wachs (s. auch Membranwachs) gehört fast stets zu den Fetten, so das Wachs der Rhus-Früchte (Japanwachs), das richtiger als **Japantalg** zu bezeichnen ist. Es besteht hauptsächlich aus Fettsäuren (E. Tassilly, Bull. Soc. Chim., 1911, IX, S. 608), in dem Unverseifbaren (nur 0,68 %) finden sich Myricylalkohol, Phytosterin, Cerylalkohol u. a. (H. Matthes und W. Heintz, Arch. d. Pharm., 1909, CCXLVII, S. 650). Der Japantalg der Rhusfrüchte wird von Tauben gefressen, ist also Anlockungsmittel und dient der Verbreitung der Samen (Moebius)[1]. Die ersten „Wachskörnchen entstehen innerhalb des Plasmaschlauches chlorophyllfreier Zellen", zu ihrer Bildung wird Stärke verbraucht (A. Meyer)[2]. Im Embryo hat das Fett noch normale Konsistenz und dient als Reservestoff. Erst im Mesokarp der reifenden Frucht nimmt es wachsartige Konsistenz an und lagert sich als weiße Krusten den Zellwänden an (Tabata)[3]. Es löst sich in Terpentinöl (Moebius), aber nicht in kaltem Alkohol und kaltem Äther, wird von Mineralsäuren nicht angegriffen und läßt sich mit Kalilauge verseifen (A. Meyer). Das Rhus-Wachs leuchtet (im Gegensatz zu den Membranwachsen) im polarisierten Lichte nicht auf.

Phytosterine.

Die Phytosterine (hochmolekulare, einwertige Alkohole, O. Hesse) stehen den Cholesterinen des Tierkörpers sehr nahe und kommen in geringer Menge in allen plasmahaltigen Zellen vor; in größerer Menge finden sie sich in den fetthaltigen Zellen sowohl in höheren als niederen Pflanzen (Rinden, Blüten, Samen, Sklerotien). In Sekreten scheinen sie häufig zugegen zu sein. Eine große Anzahl hierher gehörender Körper ist bisher isoliert worden (Phytosterin aus Physostigma, Pisum, Coffea, Colchicum, Soja, Ergosterin aus Mutterkorn, Paracholesterin aus Aethalium septicum, Lupeol aus Lupinus luteus; vorzüglich aus Leguminosen sind phytosterinartige Alkohole bekannt, ferner das Quebrachol aus Quebracho und viele andere, doch ist die Chemie mancher Phytosterine noch nicht völlig geklärt).

[1] M. Moebius, Wachsausscheidungen im Innern von Zellen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1897, XI, S. 445.

[2] A. Meyer, Über die Entwickelung des Wachses der Frucht von Rhus toxicodendron, Arch. d. Pharm., 1879, CCXVII, S. 514.

[3] S. Tabata, Über die Früchte und Keimpflanzen von Rhus succedanea L, Journ. of Coll. Univ. Tokyo, 1907, XXIII, S. 1.

Im isolierten Zustande bilden die Phytosterine perlmutterglänzende Blättchen von verschiedener Form (Rechtecke, oft mit abgestutzten Ecken oder schiefgestellten Enden und sechseckige Täfelchen), die gerade auslöschen (Cholesterinkristalle bilden viereckige rhombische Täfelchen). Sie können von den Fetten durch Verseifung getrennt werden, bleiben in dem Unverseifbaren der Fette zurück, aus dem sie durch Ätheralkohol gewonnen werden. Ihre Lösungsverhältnisse stimmen im wesentlichen mit denen der Fette überein; sie lösen sich in Äther, Chloroform, Alkohol, Ätheralkohol, heißer wässeriger und in kalter alkoholischer Chloralhydratlösung. Aus heißem Anilin scheiden sie sich sofort wieder aus, zum Teil in nadelförmigen Gebilden, die strauchartig oder zu Sternen angeordnet sind (Fig. 46a).

Die Phytosterine geben (ebenso wie die Cholesterine) einige Farbenreaktionen, die in der Chemie zur Erkennung herangezogen werden. Es sind folgende: Schwefelsäure löst nur zum Teil und färbt meist intensiv blutrot[1]) (Ergosterin löst sich völlig und ohne Färbung). Trichloressigsäure (9 + 1 Teil Wasser) färbt hell- bis rotviolett, vornehmlich nach Erhitzen oder bei Zusatz von Salzsäure. Die Chloroformlösung wird bei Zusatz von Schwefelsäure blutrot. Die Lösung in Essigsäureanhydrid wird durch Schwefelsäure vorübergehend rosenrot, dann blau. Viele Phytosterine werden durch Schwefelsäure rot gefärbt, fügt man etwas Jod zu, dann entsteht eine violette, blaue, schließlich eine rötliche Färbung. Diese Reaktionen sind für unsere Zwecke in erster Linie geeignet. Essigsäureanhydrid hat die unangenehme Eigenschaft, breit zu laufen, so daß das Arbeiten am Objektträger schwierig ist. Bringt man auf einige Splitter von reinem Phytosterin einen Tropfen Schwefelsäure, läßt darauf etwas Chloroform fallen und bedeckt mit dem Deckglase, dann sind die Chloroformtropfen in kurzer Zeit rosenrot, nach längerer Zeit braunrot gefärbt. Fügt man zu dem die Phytosterinkristalle führenden Schwefelsäuretropfen seitlich eine Spur Jodjodkalium zu, so erfolgt (neben Jodausscheidungen) eine intensive jodstärkeblaue Färbung der Kristalle, die schließlich in Gelbrot bis Rotbraun übergeht.

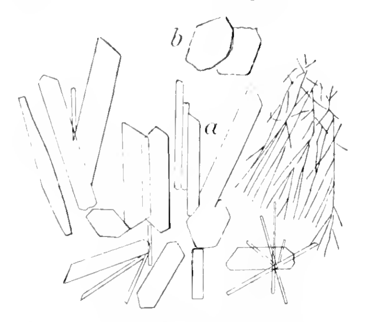


Fig. 46. *a*) Phytosterinkristalle, aus den großen Kristallen des Handelspräparates mit Alkohol am Objektträger umkristallisiert. *b*) Nicotiana tabacum (Epidermis, altes Glyzerinpräparat), hellrote Kristalle, die Phytosterinreaktion geben (Tunmann).

[1]) Bei dem mir zur Hand stehenden Phytosterin wurden alle Teilchen mit Schwefelsäure sofort rot und gingen in schaumige Massen über; nach 3—4 Stunden waren fast alle Partikelchen olivgrün (bei durchfallendem Lichte), nach längerer Zeit trat Entfärbung ein und ein Teil der Massen hatte sich unter Zurücklassung einer Haut gelöst.

Scherer[1]), welcher der Ansicht ist, daß Angaben über den Nachweis in der Pflanzenzelle noch nicht vorliegen (siehe aber weiter unten), hält „die bisher bekannten Reagentien für Phytosterine" zum mikroskopischen Nachweis für ungeeignet.

Bei der Sublimation liefert Cholesterin (Handelspräparat) sofort gut ausgebildete Kristalle (Täfelchen), während Phytosterin ein aus rundlichen und langgestreckten glänzenden Tropfen (flüssige Kristalle) bestehendes Sublimat bildet; in den Tropfen sind erst nach längerer Zeit in polarisiertem Lichte vereinzelte Kristalle zu erkennen. Der Nachweis der Phytosterine im Gewebe ist nicht leicht und gelingt selbst in Schnitten der Samen nicht gut; bessere Erfolge erhält man, wenn man einige Präparate sublimiert und die öligen Präparate nach eintägigem Liegen mit Schwefelsäure-Chloroform prüft. Weit schwieriger gestaltet sich der Nachweis in vegetativen Geweben. Er kann mit einiger Aussicht auf Erfolg nur dort geführt werden, wo größere Mengen Phytosterine zugegen sind. In Herbarmaterial und in Pflanzen, die einige Zeit in 60—70$^0/_0$ Alkohol verweilt haben, kommt es zuweilen zur Abscheidung von Kristalltäfelchen und -nadeln, welche die Chloroform-Schwefelsäurereaktion geben. Derartige Kristalle speichern Farbstoffe und erscheinen oft in gelben bis braunroten Farben (Fig. 46b).

Werden fetthaltige Präparate längere Zeit in Glyzerin aufbewahrt, dann scheiden sich in den Öltropfen bisweilen Kristalle aus. Sie werden teils als Fettsäure- teils als Phytosterinkristalle angesprochen (Bertrand). Auch beim Einlegen von Präparaten der Blütenblätter (Calendula off., Gazanea splendens, Silphium perfoliatum) in alkoholische Kalilauge bilden sich in den Öltropfen Kristalle, die Kohl[2]) für Phytosterinsphärite hält. Ebenso geben die vielerwähnten Tröpfchen in den Leukoplasten der Epidermis von Agave americana und des Stengelparenchyms von Equisetum arvense Phytosterinsphärite. Kohl faßt diese Einschlüsse als Fettbildner auf. Ihre fettartige Natur wurde übrigens schon lange vorher von A. Meyer[3]) festgestellt. Haben die Phytosterinkristalle Farbstoffe gespeichert, so kann man nach Molisch[4]) die Präparate einige Tage in Bromwasser legen und dann erst mit Schwefelsäure oder mit Schwefelsäure-Chloroform prüfen.

Zu den phytosterinartigen Alkoholen gehört das Alkornin, das bis zu 1,25$^0/_0$ in der Rinde von Bowdichia virgilioides, der Alcornoco-

[1]) H. Scherer, Über Phytosterine und einige fette Öle, Dissertation Straßburg, 1909, S. 11.

[2]) F. G. Kohl, Untersuchungen über das Carotin und seine physiol. Bedeutung in der Pflanze, Leipzig 1902.

[3]) A. Meyer, Das Chlorophyllkorn, Leipzig 1883.

[4]) H. Molisch, Ber. deutsch. bot. Ges., 1896, XIV, S. 28.

rinde des Handels, vorkommt. Es läßt sich mit Jodjodkaliumlösung nachweisen, der einige Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zugefügt sind. Man entfernt zunächst die Stärke durch mehrtägige Mazeration mit verdünnter Natronlauge und wiederholtes Auswaschen mit Wasser; nachfolgender Zusatz von Jodjodkalium-Schwefelsäure zeigt die dunkelblauen Zellulosemembranen und in den Zellen durch eine homogene Violettfärbung den Sitz des Alkornins. Alkornin findet sich im inneren Parenchym der Mittelrinde, im Bast und besonders in den Markstrahlen (Hartwich und Dünnenberger)[1]).

Leucin.

v. Gorup Besanez fand Leucin (α-Amidoisocapronsäure) in Vicia-Keimlingen auf, in denen es sich, ebenso wie in Lupinus luteus, in jungen Pflänzchen in großer Menge anhäufen kann. Im allgemeinen findet es sich aber nicht in großen Quantitäten. Es wird angegeben für die Knospen der Roßkastanie (Schulze), für Kartoffeln (Schulze, Barbieri), Zuckerrüben (Lippmann), Phaseolus, Cucurbita (Schulze), Secale cornutum (Burgermeister und Buchheim), Hefe (Schützenberger). Im Tierreich ist es in zahlreichen Insekten gefunden worden, tritt auch in Leber, Milz, Pankreasdrüse u. a. auf. Bei der Hydrolyse der Eiweißkörper entsteht Leucin in größerer Menge. Reines Leucin schmilzt bei 293—295° (E. Fischer), unreines Präparat bei 170°. Leucin ist unlöslich in Äther und Chloroform, sehr schwer löslich in Alkohol, leicht löslich in Wasser und bildet farblose, glänzende Blättchen. Es ist ein wichtiger Baustoff und pflegt Asparagin zu begleiten.

Um Leucin mikroskopisch zur Anschauung zu bringen, was aber nicht immer gut gelingt, benutzt man frische Dahliaknollen oder junge Pflänzchen von Lupinus luteus, Vicia u. a. Die nicht zu dünnen Präparate kommen in einen Tropfen Alkohol; beim Verdunsten scheidet sich (neben Asparagin und anderen Amidokörpern) Leucin in Form sehr kleiner Schuppen aus. Von den anderen Ausscheidungen kann man nun Leucin durch Sublimation trennen (Borodin)[2]). Man läßt das Alkoholpräparat einige Zeit offen liegen, um es ganz eintrocknen zu lassen, bedeckt es dann mit dem Deckgläschen und erhitzt bis auf etwa 170°. Hierbei sublimiert Leucin meist ohne Zersetzung. Die Leucinkristalle haften nun am Deckgläschen und können mit diesem entfernt werden, Asparagin findet sich nach dem Erhitzen im Präparate in schaumig-öligen Tropfen, Kaliumnitrat scheidet sich beim Er-

[1]) C. Hartwich und E. Dünnenberger, Über eine als Jaborandi in d. Handel gekomm. Alcornocorinde usw., Arch. d. Pharm., 1900, CCXXXVIII, S. 341, Dissert., Zürich 1900, S. 53.

[2]) Borodin, Über Sphärokristalle aus Paspalum elegans u. über die mikrochem. Nachweisung von Leucin, Bot. Zentralbl., 1884, XVII, S. 102.

kalten wieder kristallinisch aus. Da aber bei dieser Vorschrift Borodins das Deckglas des Trockenpräparates selbst bei vorsichtigem Erhitzen oft abgeschleudert wird (Tunmann), so ist es vorteilhafter, in der üblichen Weise auf der Asbestplatte bei möglichst niedrigem Sublimationsraum zu sublimieren.

Im Präparate selbst kann Leucin mit Borodins Methode identifiziert werden, die Leucinkriställchen wachsen in einer konzentrierten wässerigen Leucinlösung, alle anderen hier in Betracht kommenden Amidokörper und Kaliumnitratkristalle werden gelöst. Läßt man frische Präparate längere Zeit unter Deckglas in Glyzerin liegen, dann scheidet sich Leucin in ganz charakteristischen, herzförmigen Lamellen aus, die ebenfalls mit Leucinlösung identifiziert werden können, zuweilen Sphärokristalle bilden und sich in reichlicher Menge in Keimlingen finden (Lupinus albus). Nach Belzung[1]) gelangt es auch in den Interzellularräumen zur Kristallisation.

Asparagin (Glutamin, Arginin, Histidin).

Asparagin, das Amid der Amidobernsteinsäure, von Delaville 1802 in Asparagus aufgefunden, bildet sich vielfach im Stoffwechselprozeß. Reichlich findet es sich in Papilionaceen-Keimlingen, besonders in etiolierten (25 % der Trockensubstanz), aus denen man es auch darstellt (Lupinus, Vicia), Man gewinnt es aus dem wässerigen eingeengten Pflanzenextrakte, indem man die Eiweißstoffe durch Kochen abscheidet und die sich ausscheidenden Asparaginkristalle durch Umkristallisieren reinigt. Asparagin findet sich in Wurzeln (Glyzyrrhiza 2—4 %, Althaea 2 %, Symphytum officinale 1—3 %, Beta, Dahliaknollen u. a.), häufig in verdunkelten Zweigen und Knospen u. a. Pfeffer zeigte, daß bei der Verdunkelung zugleich mit der Anhäufung von Asparagin eine Abnahme an Zucker stattfindet[2]). Asparagin ist ein wichtiger Baustoff, dient zum Transport stickstoffhaltiger Substanzen, zur Regeneration des Plasma; in den Keimpflanzen fällt die Kurve des Eiweißzerfalls mit der der Asparaginbildung zusammen (Prianischnikow). Es spielt bei der Eiweißsynthese eine wichtige Rolle, doch liefert es hierzu nicht das Hauptmaterial (Zalewski)[3]). Wahrscheinlich beruht die

---

[1]) E. Belzung, Sur divers principes issus de la germination et leur cristallisation intracellulaire, Journ. de Bot., 1892, VI, S. 49.

[2]) Tichomirow hat bei den zahlreichen auf Zucker untersuchten Pflanzen (s. Glykosen) nur bei Lemna und Atropa keinen Zucker gefunden, bringt hierfür jedoch keine Erklärung; diese erscheint nach obigem naheliegend. Atropa führt Asparagin, womit weiter in Einklang steht, daß sie typische Schattenpflanze ist.

[3]) Vergl. Zalewski, Ber. bot. Ges., 1898, XVI, S. 146. — Prianischnikow, Ber. bot. Ges., 1899, XVII, S. 151. — Pfeffer, Jahrb. f. wiss. Bot., 1872, VIII, S. 533. — Löw, Chem. Ztg., 1896, XX, Nr. XVI. — Die zahlreichen Arbeiten von E. Schulze u. s. Schülern, in Landwirtsch. Versuchsst., Ber. bot. Ges., 1907, XXV, S. 213 u. a.

Asparaginbildung auf einen enzymatischen Vorgang. Nach E. Schulze verwendet die Pflanze zur Asparaginbildung Bernsteinsäure. Nach Prianischnikow[1]) entsteht „Asparagin hauptsächlich oder ausschließlich in den wachsenden Teilen auf sekundäre Weise aus den gewöhnlichen Eiweißzerfallprodukten".

Da Asparagin in den lebenden Zellen in gelöster Form auftritt und sehr leicht in Wasser, dagegen kaum in Alkohol löslich ist, so benutzt man in erster Linie Alkohol zum mikrochemischen Nachweis. Vorteilhaft bedient man sich frischen Materials und benutzt zu Demonstrationszwecken Spargel oder 2—3 cm dicke Dahlienknollen, auch etiolierte Keimlinge und Althaeawurzeln. Die etwa 0,3—0,5 mm starken Präparate kommen auf dem Objektträger in absoluten Alkohol und werden mit dem Deckglas bedeckt. Nach dem völligen Verdunsten des Alkohols hat sich Asparagin in Täfelchen ausgeschieden. Über-

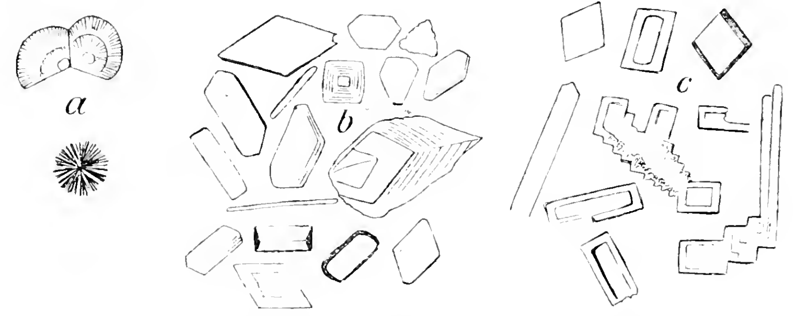


Fig. 47. Asparaginkristalle a) aus dem Handelspulver deutscher Altheawurzel, b) aus Atropa belladonna (Blatt) mit Alkohol gefällt; c) Salpeterkristalle aus Nicotiana tabacum (Stengel) mit Alkohol gefällt (Tunmann).

wiegend bilden sich rhombische Täfelchen mit stumpfen Winkeln und abgestutzten Ecken. Zum Teil wird die Kristallform von der Art der Verdunstung und der Menge des vorhandenen Asparagins beeinflußt. Bei sehr langsamem Verdunsten und bei Gegenwart von reichlichen Mengen resultieren auch Nadeln, bei sehr schnellem Verdunsten federartige Skelette. Die Kristalle sind unlöslich in Chloroform, Benzol, ätherischen Ölen, lösen sich leicht in verdünnten Säuren, Ammoniak, Chloralhydrat und Kalilauge. Die Angabe von Walliczek[2]), daß Asparagin in Ammoniak und Kalilauge unlöslich sein soll, trifft nach meinen Befunden weder für die Handelsware noch für die mit Alkohol aus Pflanzen gefällten Asparaginkristalle zu (Fig. 47).

[1]) D. Prianischnikow, Zur Frage der Asparaginbildung, Ber. bot. Ges., 1904, XXII, S. 21.

[2]) H. Walliczek, Studien über den Membranschleim vegetat. Organe, Dissert. Bern, 1893, S. 50, Jahrb. f. wiss. Bot., 1893, XXV, S. 209.

Die sich gleichzeitig ausscheidenden Kaliumnitratkristalle stellen ähnliche Täfelchen dar, die aber nicht so regelmäßig auskristallisieren und nur rechte Winkel zeigen[1]) (Fig. 47c). Zur weiteren Unterscheidung von Kaliumnitratausscheidungen stehen 2 Methoden zur Hand. Kaliumnitratkristalle geben eine Salpetersäurereaktion, lösen sich somit mit tiefblauer Farbe in Diphenylaminschwefelsäure[2]) oder rot in Brucinschwefelsäure. Um aber einen sicheren Schluß fällen zu können, muß der Zusatz der Reagentien sehr vorsichtig geschehen, so daß man die Reaktion unter dem Mikroskop genau verfolgen kann. Anderseits läßt sich Borodins Verfahren[3]) zur Differentialdiagnose verwenden. Es müssen bei Zusatz einer gesättigten wässerigen Asparaginlösung die Asparaginkristalle an Größe zunehmen, die Kaliumnitratkristalle sowie alle anderen wasserlöslichen Substanzen im Wasser des Reagens aber gelöst werden. Andere in Wasser schwer lösliche Ausscheidungen, wie Tyrosin, bleiben hierbei erhalten, wachsen aber nicht. Tyrosin (s. d.) wird überdies durch Millons Reagens rot. Eine gesättigte Kaliumnitratlösung kann man zur Borodinschen Methode wegen der großen Löslichkeit des Kaliumnitrats nicht anwenden. Doch finde ich, daß sich die Salpeterkristalle weit leichter in Wasser lösen als Asparagin. Bei kräftigem Anhauchen und sofortiger mikroskopischer Kontrolle sind meist die Salpeterkristalle verschwunden, während die Asparaginkristalle erhalten bleiben; erstere kann man nach wenigen Augenblicken wieder anschießen sehen. — Schließlich lassen sich die Erscheinungen, die beim Erhitzen der Kristalle auftreten, zur Unterscheidung heranziehen. Erwärmt man die aus Alkohol gewonnenen und am Deckglas haftenden Asparaginkristalle bis auf etwa 100°, dann lösen sie sich in ihrem Kristallwasser und bilden ölartige Tröpfchen, die wasserlöslich sind; beim Erhitzen der Kristalle (auf 200°) entstehen braune, schaumige, in Wasser unlösliche Massen. Kaliumnitrat wird beim Erwärmen bis auf 100° nicht zersetzt, die Nitratkristalle sind nach dem Abkühlen wieder sichtbar.

Beim Einlegen größerer lebender Pflanzenteile (junge Süßholzwurzeln) in Alkohol scheidet sich Asparagin auch in Form kleiner dendritischer Kristalle oder feiner Nädelchen aus. Letztere gruppieren sich bisweilen um einen Punkt und bilden sphärokristallinische Gebilde. Derartige Ausscheidungen finden wir, wenn wir die aus Alkoholmaterial

---

[1]) A. Zimmermann, Mikrotechnik, 1892, S. 80, Anm.

[2]) C. O. Müller, Ein Beitr. z. Kenntnis d. Eiweißbild. in d. Pflanzen, Dissert. Leipzig, 1886, auch Serno, Landwirtsch. Jahrb., 1889, S. 877.

[3]) Borodin, Üb. d. phys. Rolle u. d. Verbreit. d. Asparagins im Pflanzenreiche, Bot. Ztg., 1878, XXXVI, S. 801.

hergestellten Schnitte direkt in Alkohol beobachten[1]. Sphärokristalle trifft man häufig im Handelspulver der deutschen Althaea an (Fig. 47a). Es erscheint mir aber fraglich, ob in ihnen das Asparagin in reiner Form vorliegt, denn diese Bildungen reagieren zwar positiv nach Borodin, lösen sich aber schwer in verdünnten Alkalien. Keineswegs gelangen auf diese Weise die gesamten Asparaginmengen zur Kristallisation. Diese kann nämlich durch Polysaccharide (Schleim, Gummi, Inulin) mehr oder weniger gehindert werden, bisweilen ganz unterbleiben. Man bringt in solchen Fällen die Kristallisation derart zustande, daß man 1 cm starke Pflanzenteile in Alkohol legt. Schon in wenigen Tagen pflegen sich auf den Schnittflächen bis 1 mm große Kristalle (rhombische Säulen) auszuscheiden. Die mit Kristallen bedeckte Schnittfläche des Pflanzenstückes wird zum mikroskopischen Präparate benutzt. Die Angabe Leitgebs[2], daß auch Glyzerin die Kristallisation hindere, gilt für konzentriertes Glyzerin wenigstens nicht. Denn bei lebend in konzentriertes Glyzerin eingelegten dicken Präparaten der Süßholzwurzel fand ich oft Asparaginkristalle (Sphärokristalle) und Belzung[3]) fand beim Einlegen in reines Glyzerin in den Interzellularräumen rhombische und rechteckige (?) Tafeln von Asparagin. Dann ist das Asparagin nicht mehr am Orte seiner Entstehung.

Zur Auffindung geringer Asparaginausscheidungen bedient man sich des polarisierten Lichtes. Die Kristalle treten dann farbig leuchtend deutlich hervor. Salpeter leuchtet im allgemeinen nicht so lebhaft, nur die größeren Kristalle zeigen blaue und rote Polarisationsfarben.

Als Hilfsreaktion beim Nachweis aliphatischer Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure u. a.) dient Chinon (s. Eiweiß). Bei Asparagus wird vornehmlich das Leptom gerötet; in erwachsenen Teilen ist die Rötung in den Siebröhren am stärksten.

Über die anderen bei dem Zerfall und dem Aufbau von Eiweiß beteiligten Amidokörper liegen genügende mikrochemische Untersuchungen nicht vor. Die Chemie dieser Körper (Glutamin, Tyrosin [s. Eiweiß], Arginin, Lysin, Histidin u. a.) wurde in erster Linie von der Schule E. Schulzes geklärt. In etiolierten Keimpflanzen finden sich Arginin, Histidin, Lysin, Cholin (S. 179), Trigonellin (s. Alkaloide), Lupanin. Im Stoffwechsel werden wieder verbraucht: Arginin, Histidin, Lysin, Cholin: nicht verbraucht werden Trigonellin, Lupanin,

[1]) Dahmen, Über den Funiculus der Samen, Dissertat. Erlangen, 1891, S. 12.

[2]) H. Leitgeb, D. Gehalt d. Dahliaknollen an Asparagin u. Tyrosin, Mitt. bot. Inst., Graz 1888, Heft 2, S. 215.

[3]) E. Belzung, Sur divers principes d. l. germination et leur cristallisation intracellulaire, Journ. de Bot., 1892, VI, S. 49.

Betain. Studienobjekte sind etiolierte Keimpflanzen (Lupinus, Cucurbita pepo, Helianthus, Vicia u. a.). Glutamin wird man relativ leicht beim Asparaginnachweis mittels Alkohol erhalten (Stachysknollen, Vicia- und Cucurbita-Keimlinge), wenn man die Alkoholpräparate einige Tage im Exsikkator austrocknet. Die Glutaminnadeln lösen sich sehr leicht in Wasser (beim Anhauchen), sind aber in absolutem Alkohol unlöslich. Mit Pikrolonsäure erhält man fast stets im Gewebe etiolierter Keimlinge tiefgelbe, kristallinische Niederschläge, doch müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob bei diesen sich Arginin, Histidin oder noch andere Amidokörper beteiligen. Nach Brigl[1]) geben Arginin und Histidin mit Pikrolonsäure ein gelbes Monosalz und eine orangefarbene Diverbindung.

Cholin und Betain.

Cholin (Trimethyl-oxyäthylammoniumhydroxyd) tritt präformiert in den Zellen auf, ist ferner ein Spaltungsprodukt der Lezithine und wird im Gegensatz zum Betain im Stoffwechsel wieder verbraucht[2]). Betain (Trimethylglycocoll) entsteht bei der Oxydation des Cholins und begleitet daher meist das Cholin. Cholin ist gefunden worden in Pilzen (Secale cornutum, Helvella esculenta, Boletus luridus), in etiolierten Keimpflanzen (Lupinus, Vicia, Pisum u. a.) und in Trigonella, Gossypium, Cannabis, Vicia, Fagus, Strophanthus, Areca catechu, Arachis u. a. (Samen), Atropa, Ipecacuanha, Althaea, Acorus calamus, Beta vulgaris (Wurzeln), Artemisia cina (Blüten), Solanaceen (Atropa, Hyoscyamus), Helianthus annuus u. a.

Mikrochemische Erfahrungen über den Nachweis von Betain und Cholin fehlen. Bei orientierenden Versuchen, die im folgenden angeführt sind, erwies sich Helianthus annuus als geeignetes Versuchsobjekt. Als Reagentien kommen in Betracht: Brom-, Chlor- und Joddämpfe, Platin- und Goldchlorid, weniger geeignet ist Sublimat, guten Erfolg gibt Jodjodkalium in angesäuerten Schnitten. Setzt man Schnitte (Stengel, Blattstiel, Blattnerv) den Dämpfen von konz. Salzsäure aus, dann gelangen Kristallkomplexe zur Abscheidung, die auf einzelne Zellgruppen beschränkt sind, teils sphäritischen Aufbau zeigen, teils aus aufeinandergelegten Kristallplatten bestehen. Sie lösen sich in Wasser und zurückbleiben farblose ölige Tropfen und tiefbraune Massen, die sich zu schmierigen Klumpen zusammenballen. Kalzium fehlt oft. Es ist nicht ausgeschlossen, daß es sich um Ammoniumchlorid und um

[1]) Pikrolonsäure wurde von Kossel, Weiß u. a. zur quantitativen Bestimmung von Arginin und Histidin benutzt (Brigl, Ztschr. f. phys. Chem., 1910, LXIV, S. 337 u.: E. Schulze u. Winterstein, Ztschr. f. phys. Chem., 1910, LXV, S. 431).

[2]) Zahlreiche Arbeiten von E. Schulze und Trier (Zeitschr. f. phys. Chem. u. Landw. Jahrb.).

organische Substanz handelt. Den übrigen Reaktionen zufolge, die übrigens nicht gut ausfielen, scheint Cholin (und Betain?) im Plasma aufzutreten (besonders an den Trichomen zu sehen) und zwar in den Palisaden, obere Epidermis (?), Leitparenchym, in subepidermalen Zellen und in Trichomen. Starke Reaktionen zeigen die Zellen, welche die Blattbündel an ihrer Oberseite begrenzen. Die Cholin führenden Zellen zeichnen sich zuweilen durch ihren Gehalt an phosphorsaurem Kalk aus, so daß es den Anschein gewinnt, als ob Cholin und Kalziumphosphat in loser Bindung auftreten. Die Cholinzellen (auch die besprochenen Kristalle) gaben starke Reaktion mit Nesslerschem Reagens. Helianthus annuus bietet für den Mikrochemiker ein in vieler Hinsicht vorzügliches Studienobjekt. Bei anderen Objekten (Secale cornutum) scheinen andere Verhältnisse vorzuliegen und das Alter der Lagerung scheint von Einfluß zu sein, daher ist lebendes Material zu benutzen.

In neuerer Zeit hat Staněk[1]) die Lokalisation des Betains studiert. Diese Arbeit kam erst bei der Korrektur durch ein Referat von Matouschek zu meiner Kenntnis. Mikrochemische Methoden sind in dem Referate nicht erwähnt. Im Samen von Beta und Amaranthus ist Betain nur in der Samenschale und in größerer Menge im Frühjahr in jungen Blättern zugegen. Betain soll kein Reservestoff sein, aber „eine wichtige Aufgabe im Kreislaufe des Stickstoffes" spielen.

Allantoin.

Allantoin (ein Derivat der Nukleinbasen,?) entsteht bei der Oxydation von Harnsäure und bildet Prismen, die sich unter Deckglas schwer in kaltem Wasser, nicht in kaltem Alkohol lösen. Es ist aufgefunden worden in Sprossen und Trieben von Acer und Platanus (0,3—1,0 %), in der Rinde von Aesculus hippocastanum, in Weizenkeimen (0,5 %), in Cordia excelsa (Blatt 0,26 %, Rinde 0,78 %), Symphytum officinale (0,6—0,8 %). — Im Tierreich findet es sich im Harn (bei Neugeborenen und bei krankhaften Zuständen).

Mit der Mikrochemie hat sich in neuerer Zeit Harvey-Gibson[2]) beschäftigt. Allantoin wird im Rhizom von Symphytum officinale mit Quecksilbernitrat nachgewiesen (weißer Niederschlag) und ist im Parenchym der Markstrahlen und der Rinde lokalisiert. Bei der Droge tritt die Reaktion nicht genügend scharf ein, so daß eine weitere Untersuchung erwünscht ist, die auch die Natur der Tröpfchen von „fettähnlichem" Aussehen aufzuklären hätte. Ferner scheinen kristallinische Ausscheidungen (nicht polarisierende Stäbchen) vorzukommen. Das Sublimat der Droge besteht aus Tröpfchen, die sich leicht in Wasser und in Alkohol lösen: aus der alkoholischen Lösung

[1]) Staněk, Über die Lokalisation des Betains in der Pflanze, Sitzber. böhm. Ges., Prag 1912, S. 1 (Tschechisch), Bot. Centralbl. 1912, CXX, S. 363.

[2]) R. J. Harvey-Gibson, Pharm. Journ., 1912, LXXXVIII, S. 91.

scheidet sich ein kleinkristallinischer Niederschlag ab. Salpetersäure färbt gelb. Wahrscheinlich sind im Sublimat Spaltungsprodukte von Allantoin zugegen.

Hexosen und Saccharosen.

Von den seit den klassischen Arbeiten Emil Fischers synthetisch hergestellten Zuckerarten kommen nur relativ wenige in den Pflanzen vor. Die Zuckerarten sind in der Zelle teils in freiem Zustande teils in glykosidischer Bindung enthalten. In größerer Menge treten frei die Hexosen auf, sowohl der Traubenzucker (Glykose im engeren Sinne, Dextrose) als auch der Fruchtzucker (Fruktose, Laevulose). Hexosen nehmen im Leben der Zellen neben den Eiweißstoffen den ersten Platz ein. Sie sind die ersten greifbaren Assimilationsprodukte, fehlen wohl keiner pflanzlichen Zelle. Als Hexosen wandern die Kohlehydrate. In größerer Menge finden wir sie in Wurzeln und Früchten, während sie in den reifen Samen gegenüber den anderen Reservestoffen stark zurücktreten und erst wieder bei der Mobilmachung der Reservestoffe gebildet werden. In den Früchten dienen sie als Anlockungsmittel für Vögel zum Verschleppen der Samen, wodurch gleichzeitig die Samen (durch Passieren des Darmkanals) leichter zum Keimen kommen. Der Nektar dient den Insekten zur Nahrung (Pollenübertragung).

Der Traubenzucker gehört zu den Aldohexosen (Aldosen). Zu dieser Gruppe zählt d-Mannose und d-Galaktose. d-Mannose, das Aldehyd des Mannits, aus den Orangenschalen hergestellt, wurde nur in kleinen Quantitäten gefunden. Derivate der Mannose sind die in der Reservezellulose vorkommenden Mannane. Galaktose ist mit Sicherheit frei noch nicht gefunden. Die Derivate (Galaktane) siud ebenfalls membranbildende Substanzen. Der Fruchtzucker zählt zu den Ketohexosen (Ketosen), wohin auch die Sorbose gehört, die neben Sorbit in kleinen Mengen in den Früchten von Sorbus aucuparia angetroffen wurde.

Rohrzucker (Saccharose im engeren Sinne, eine Hexobiose, ein Disacharid), der durch Säuren und Fermente in seine beiden Spaltlinge, Dextrose und Laevulose, zerfällt, ist ebenfalls in allen chlorophyllhaltigen Organen gefunden worden, muß jedoch zur Nutzbarmachung erst in seine Komponenten übergeführt werden. Bei der Keimung der Dattel bildet er die erste Kohlehydrat-Nahrung des Embryo und erst später werden die in den Membranen enthaltenen Galakto-Mannane in ausnützbare Zucker (Mannose und Galaktose) übergeführt. Bei seiner Wanderung zum Sproß geht er in (transitorische) Stärke über. Ein gutes Objekt, um die Rohrzuckerbildung aus Traubenzucker zu verfolgen, ist nach J. Grüss (Ber. bot. Ges., 1898, XVI, S. 17) das Skutellum monokotyler Samen. Wo Rohrzucker in größerer Menge auftritt, kommt ihm der Charakter eines Reservestoffes zu. Als solcher tritt er in vielen Wurzeln (Umbelliferen) und in Stengeln (Palmen, Saccharum) auf. Durch Kultur und Zuchtwahl hat man den Rohrzuckergehalt von Beta vulgaris von 8 bis auf 16 % erhöht. Der Saft der Stengel von Saccharum officinarum führt bis zu 20 %, der von Acer saccharum noch mehr Rohrzucker und im Stengel von Zea mays läßt er sich durch Entfernen der unreifen Kolben bis auf 12—14 % der frischen Stengel anreichern. In

den Nektarien vieler Blüten ist ebenfalls Rohrzucker zugegen. In einigen Blüten finden sich sogar größere Mengen, so enthalten die Blüten von Sesbania grandiflora Poir. nach Boorsma 8% der Trockensubstanz an Rohrzucker (neben 44,3% Invertzucker; Teysmannia 1910).

Zu den Disacchariden zählen noch die Maltose, die nur in kleinen Mengen in freiem Zustande vorkommt (Sojabohnen) und die Mykose (Trehalose) der Pilze (Secale cornutum).

Der Gang der Zuckerbildung und -Umwandlung ist beim Zuckerrohr sehr regelmäßig. Organe, die kein Wachstum mehr zeigen, speichern Saccharose, im Wachstum begriffene Gewebe führen Glykose und Fruktose (Went, Chem.-phys. Unters. üb. d. Zuckerrohr, Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXI, S. 325).

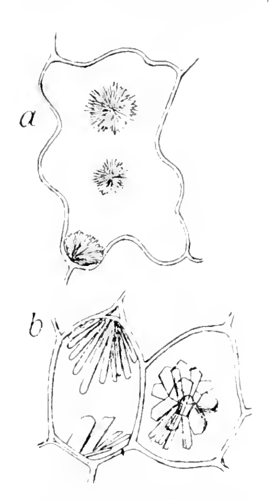


Fig. 48. Zuckerkristalle in Glyzerinpräparaten, a) Urginea maritima, b) Phoenix dactylifera (Tunmann).

Hexosen und Saccharosen sind in den lebenden Zellen stets in Lösung, scheiden sich auch beim Trocknen der Pflanzen nur relativ selten in kristallinischen Bildungen aus, da unreine Zucker nur schwer kristallisieren. Im Herbarmaterial, in Drogen und im Alkoholmaterial findet man nur selten Zuckerkristalle, die, da sie wasserlöslich sind (Rohrzucker löst sich auch in Alkohol), in Glyzerin oder Ölpräparaten betrachtet werden (Fig. 48). Bekannt sind Zuckerausscheidungen der Feige (dünne Blättchen), Dattel, des Johannisbrotes, der Rosinen u. a. Nadelförmige Zuckerkristalle finden wir in Bulbus Scillae, den Blättern von Convallaria und zuweilen bei frisch in Alkohol eingelegten Samen von Colchicum autumnale. Besser ausgebildete Kristalle erhält man bei frisch in Glyzerin eingelegten Präparaten (Fig. 48).

Der mikrochemische Nachweis der Hexosen (Traubenzucker oder Dextrose, und Fruchtzucker oder Laevulose) und Saccharosen (Rohrzucker und Maltose) datiert von Sachs[1]) her, welcher die von Trommer entdeckte Methode in die mikroskopische Technik einführte: diese benutzt bekanntlich die Fähigkeit der Hexosen, alkalische Metallsalzlösungen unter Abscheidung der Metalle in der Hitze zu reduzieren. Nicht zu dünne Schnitte, die wenigstens zwei unversehrte Zelllagen enthalten und vorher nicht gewässert haben dürfen (Drogen sind trocken zu schneiden), gelangen auf 1 bis 5 Minuten in eine konzentrierte Kupfersulfatlösung, werden dann rasch mit destilliertem Wasser oberflächlich abgespült und auf einen bereit gehaltenen Objektträger in 1 bis 2 Tropfen siedende Kalilauge (Kaliumhydroxyd und Wasser zu gleichen Teilen)

[1]) J. Sachs, Über einige neue mikrosk.-chem. Reaktionsmethoden, Sitzber. d. Münchener Akad., 1859, S. 8; Flora, 1862, S. 289 und Jahrb. f. wiss. Bot., 1864, III, S. 187.

übertragen. Die Dauer der Einwirkung der Kupferlösung richtet sich nach der Dicke der Schnitte und nach der Beschaffenheit der vorhandenen Gewebe (meist genügen 2 Minuten). Zellen, die Dextrose oder Laevulose führen, zeigen bald nach dem Eintragen in die heiße Lauge einen orange- oder rotgelben, feinkörnigen Niederschlag (Gerinnsel) von reduziertem Kupferoxydul. Die rohrzuckerhaltigen Zellen werden zunächst nur durch blaue Färbungen angezeigt. Kocht man nun die Präparate einige Zeit und führt man so den Rohrzucker in Invertzucker (Dextrose und Laevulose) über, dann erscheint von neuem ein mennigeroter Niederschlag von Kupferoxydul.

Wie nun in der Chemie Trommers Reagens von Fehling verbessert wurde und jetzt vorwiegend die Fehlingsche Lösung benutzt wird, so ging man auch in der Mikrochemie zum Gebrauch der Fehlingschen Lösung über bei der die Lauge mit Seignettesalz (saurem weinsaurem Natrium) versetzt ist. Da die fertige Lösung jedoch nur kurze Zeit unzersetzt haltbar ist, so hält man sich die einzelnen Bestandteile derselben in getrennten Lösungen vorrätig und mischt letztere erst beim Gebrauch. Nach Dragendorff[1]) führt man drei getrennte Lösungen, von denen in je 1 Liter die erste 35 g Kupfersulfat, die zweite 173 g Seignettesalz, die dritte 120 g Ätznatron enthält. Nach Schimpers[2]) Vorgange bringt man auf den Objektträger einen großen Tropfen Wasser und je einen kleinen Tropfen der eben genannten Lösungen, mischt die Flüssigkeit mit einem Glasstabe (an Präpariernadeln würde sich Kupfer abscheiden), trägt in die derart frisch bereitete Fehlingsche Lösung die Schnitte ein, bedeckt mit dem Deckgläschen und erhitzt bis zur Blasenbildung. Einfacher hält man sich nach Allihn[3]) nur zwei Lösungen vorrätig. Lösung 1 besteht aus 34,6 g Kupfersulfat in 500 ccm destilliertem Wasser, Lösung 2 enthält in 500 ccm Wasser 173 g Seignettesalz und 125 g Kaliumhydroxyd. Diese Lösungen halten sich bei gutem Verschluß und wenn man nicht mit unsauberen Glasstäben hineinkommt, selbst bei häufigem Gebrauch mehrere Jahre. Zur Untersuchung werden gleiche Teile von jeder Lösung auf dem Objektträger vermischt. Übrigens läßt sich die Brauchbarkeit sowohl der nach Dragendorff als nach Allihn erhaltenen Lösungen sehr leicht feststellen. Man hat nur nötig, die Lösung für sich zu erhitzen, wobei sie sich nicht reduzieren darf.

Die Reaktionen mit Fehling haben nun verschiedene Nachteile. Zu diesen zählt der Umstand, daß der durch Hexosen bewirkte Niederschlag von Kupferoxydul nicht streng auf die zuckerhaltigen Zellen lokalisiert ist, sondern als amorphe flockige Masse, besonders bei etwas längerem Erhitzen, sich im ganzen Präparate verteilt. Um diesen

[1]) Dragendorff, Die qualitative und quantitative Analyse von Pflanzenteilen, 1882, S. 70.

[2]) A. F. W. Schimper, Anl. z. mikr. Unt. d. veget. Nahr.- u. Genußm., Jena 1900 und Strasburger, Bot. Prakt., II. Aufl., 1887, S. 73.

[3]) Allihn, Journ. prakt. Chem., XXII, S. 55.

Nachteil zu beheben und um die Bildung störenden Kupferoxyds zu umgehen, schlug A. Meyer[1]) nachstehende Methode vor: „Man stellt 2 bis 4 Zelllagen dicke Schnitte der zu untersuchenden Pflanzenteile her, legt sie kurze Zeit in eine gesättigte Lösung von Kupfersulfat, schwenkt sie schnell einmal in Wasser ab und bringt sie sofort in eine siedende Lösung von 10 g Seignettesalz und 10 g Ätzkali in 10 g Wasser. Nach einigen Sekunden ist in allen Zellen, welche reduzierenden Zucker enthalten, ein meist kristallinischer Niederschlag von Kupferoxydul entstanden, während die anderen Zellen vollkommen farblos bleiben. Dieses Verfahren liefert sehr brauchbare Resultate. Für zartere Freihandschnitte genügt ein Aufenthalt von 2 bis 3 Minuten in der Kupfersulfatlösung. Auch empfiehlt es sich, die Schnitte nach dem Abspülen mit Wasser direkt in den auf dem Objektträger befindlichen Tropfen Alkalilösung zu bringen, das Deckglas aufzulegen und nun bis zur Blasenbildung zu erhitzen.

Ähnliche Erfolge liefert die Methode von A. Fischer[2]), der Glykosen in Gefäßen nachwies, indem er median gespaltene Holz- oder Stengelstücke auf 5 Minuten in konzentrierte wässerige Kupfersulfatlösung einlegte, mit Wasser abspülte und sie alsdann in einer siedenden Lösung von Seignettesalz-Natronlauge (86,5 g Seignettesalz, 60 g Ätznatron in 1000 g Wasser) 2 bis 5 Minuten kochen ließ. Aus den Stücken werden die Präparate hergestellt und am besten in Glyzerin beobachtet. Zu Versuchen kann getrocknetes Holz dienen sowie jedes in größeren Stücken in Alkohol eingelegte Material (hierbei wird Rohrzucker herausgelöst), von dem vor der Reaktion die Schnittflächen entfernt werden müssen. Der Niederschlag bleibt auf die zuckerführenden Elemente gut lokalisiert.

Elegante Resultate gibt die Reaktion von Flückiger[3]) mit festem Kupfertartarat, die sich sonderbarerweise in botanischen Kreisen nicht Eingang verschafft hat. Das Kupfertartarat kann in sehr einfacher Weise selbst hergestellt werden. 30 g Kupfersulfat werden in 300 g heißem Wasser und 70 g Seignettesalz in 200 g heißem Wasser gelöst. Beide Lösungen werden gemischt, der Niederschlag wird gesammelt, getrocknet, und, nachdem er einige Tage im Exsikkator gelegen, in einem kleinen braunen Gefäße aufbewahrt. Das Kupfertartarat ist haltbar,

[1]) A. Meyer, Mikrochemische Reaktion zum Nachweis der reduzierenden Zuckerarten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1885, III, S. 332.

[2]) A. Fischer, Beiträge zur Physiologie der Holzgewächse, Jahrb. f. wiss. Bot., 1890, XXII, S. 73.

[3]) F. A. Flückiger, Pharmaz. Chem., Pharmakognosie u. auch in Flückiger u. Tschirch, Grundlagen der Pharmakognosie, 1885, S. 237.

wenigstens besitzt ein selbst bereitetes über 3 Jahr altes Präparat noch seine volle Wirksamkeit. Zur Reaktion wird eine kleine Menge auf dem Objektträger in einem Tropfen 15—20 % Natronlauge gelöst und nach erfolgter Lösung der Schnitt eingetragen und das Präparat mit dem Deckglas bedeckt. Statt der Natronlauge kann man auch ein Körnchen Ätznatron auf dem Objektträger in Wasser auflösen und erst in dieser frisch bereiteten Lauge etwas Kupfertartarat lösen. Das ist aber umständlicher und einen Vorteil habe ich dabei nicht wahrgenommen. Die Vorteile der Flückigerschen Methode sind erhebliche. Fruchtzucker (Fruktose) scheidet sofort (ohne Erwärmung!) rotgelbes Kupferoxydul ab, der Niederschlag ist gut lokalisiert. Ein bei nachfolgendem gelindem Erwärmen neu entstehender Niederschlag zeigt Traubenzucker an, bei längerem Erwärmen auch Dextrin. Hingegen entsteht kein Niederschlag, falls nur Rohrzucker oder Mannit zugegen ist.

Gegenüber dem Flückigerschen Verfahren bietet die Zuckerreaktion mit angesäuertem Kupferazetat von Barfoed[1]) keine Vorteile. Sie teilt mit der Reaktion von Sachs den Nachteil, daß der Niederschlag nicht auf die zuckerhaltigen Zellen beschränkt bleibt und zeigt keine Saccharose (Rohrzucker) an. 13,3 g neutrales kristallisiertes Kupferazetat wird in 200 g Wasser gelöst und zu 200 ccm dieser Lösung 5 ccm 38 % Essigsäure (1,0502 spez. Gew.) zugefügt. Die Reaktion wird in kleinen Porzellanschälchen vorgenommen. Nicht zu dünne Schnitte werden mit etwa 5 ccm kurz aufgekocht. Nach 2 bis 3 Stunden erscheinen die Präparate von ausgeschiedenem Kupferoxydul rot und ein roter Niederschlag findet sich auf dem Boden der Porzellanschälchen. Daß Rohrzucker nicht in Reaktion tritt, läßt sich leicht an Präparaten der Zuckerrüben veranschaulichen.

Kurz hingewiesen sei auf den Nachweis mit alkoholischer Kupferazetatlösung von Lidforss[2]), der durch Anwendung einer alkoholischen Lösung den störenden Einfluß evtl. anwesender, reduzierender und alkohollöslicher Nicht-Glykosen auszuscheiden bestrebt ist. Es werden 2 Lösungen vorrätig gehalten, eine alkoholische Lösung von Kupferazetat mit wenig Essigsäure und Glyzerin versetzt, sowie eine alkoholische Natronlauge. Zur Reaktion mischt man je einen Tropfen der Lösungen auf dem Objektträger, legt die Präparate ein und bedeckt mit dem Deckglase. Nach einiger Zeit entsteht ein auf die zuckerhaltigen Zellen beschränkter Niederschlag; durch Erwärmen (da eine alkoholische Lösung vorliegt, auf der Asbestplatte oder auf dem Wasserbade) wird die Reaktion beschleunigt. „Was die Empfindlichkeit des Reagens anlangt, so scheint es der Fehlingschen Lösung nicht erheblich nachzustehen und ist dem Barfoedschen Reagens entschieden überlegen.“

---

[1]) C. Barfoed, Ztschr. f. analyt. Chem., 1873, XII, S. 27.

[2]) B. Lidforss, Über die Wirkungssphäre der Glykose- und Gerbstoffreagentien, Lunds Univ. Årsskr., 1892, XXVIII, Sep.

Es war oben schon gesagt (S. 183), daß wir mit den Methoden von Sachs und A. Meyer Glykosen neben Saccharosen nachweisen können. Bei kurzem Aufkochen entstehende Niederschläge werden durch Glykosen hervorgerufen, während rohrzuckerhaltige Zellen zunächst nur eine intensiv blaue Färbung annehmen und erst bei längerem Kochen (wobei Rohrzucker invertiert wird) Niederschläge geben. Da aber bei dem längeren Kochen zweifelsohne auch aus anwesenden Glykosiden Zucker abgespalten wird und sich die Glykoside vor der Reaktion schwer entfernen lassen, so ist es vorteilhafter zum Nachweis von Glykosen und Rohrzucker die Verfahren von Czapek[1]) und Hoffmeister[2]) anzuwenden. Hierbei wird der Rohrzucker durch Hefeinvertin invertiert. Das Hefeinvertin wird gewonnen, indem man frische, rasch getrocknete Hefe mit Wasser zu einem dicken Brei anrührt, den Brei 12 Stunden bei 40° stehen läßt und dann abpreßt. Das Extrakt wird filtriert und mit Alkohol gefällt. „Der Niederschlag ist ein gelblichweißes in Wasser lösliches Pulver.“ Dieses derart gewonnene Invertin wird in konz. wässeriger Lösung benutzt. Diese Invertinlösung zeigt nur kurze Zeit eine zuverlässige Wirkung. Es werden nun Vergleichspräparate, Schnitte aus frischem Material von 3—4 Zelllagen Dicke, in Untersuchung genommen. Ein Teil der Schnitte wird direkt nach A. Meyer behandelt. Ein anderer Teil der Präparate kommt auf dem Objektträger auf wenigstens 3 Stunden in einen Tropfen Hefeinvertinlösung; ist der Tropfen eingedunstet, so wird von neuem befeuchtet; alsdann werden die Schnitte nach kurzem Abspülen mit Wasser in gleicher Weise untersucht. Ist Rohrzucker zugegen, so werden natürlich die Präparate, die in der Invertinlösung lagen, weit stärkere Reaktionen geben, als die anderen, die nur Traubenzucker enthielten oder gar frei von Glykosen waren.

Nun ist zu beachten, daß wohl die Inversion des Rohrzuckers in 3 Stunden meist beendet ist, daß jedoch die Invertinlösung durch starke Membranen sehr schlecht diffundiert. In starkwandige Zellen (Samenendospermen) war die Invertinlösung oft nach 12 Stunden noch nicht genügend eingedrungen. Hoffmeister hält eine dreistündige Einwirkung für ausreichend, doch hat er überwiegend zartwandige Objekte untersucht (starke Wände haben von dem geprüften frischen Material die Samen von Cocos nucifera und von dem getrockneten die Samen von Coffea arabica und Castanea vesca). Mein Befund stimmt überein

[1]) F. Czapek, Über die Leitungswege der organischen Baustoffe im Pflanzenkörper, Sitzber. Wiener Akad., 1897, CVI, 1, Sep., S. 14.

[2]) C. Hoffmeister, Über den mikrochemischen Nachweis von Rohrzucker in pflanzlichen Geweben, Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXI, S. 688.

mit den Erfahrungen von Grüss[1]), nach dem Invertinlösung in mit dichtem Plasma erfüllte Zellen gleichfalls schwer eindringt. Es bleibe dahingestellt, ob das Eindringen durch starke Zellmembranen oder durch dichtes Plasma erschwert wird, jedenfalls wird man in Fällen, in denen bei dreistündiger Einwirkung noch kein Rohrzucker nachweisbar ist, zur Sicherheit einige Präparate 12, sogar 24 Stunden in größeren Mengen Invertinlösung belassen, der man als Antiseptikum eine Spur Thymol zusetzen kann. Nach Hoffmeister soll man statt Invertin auch Emulsin zur Spaltung benutzen können; nach meinen Untersuchungen dringt Emulsin aber noch schwerer in die Zellen ein. Glyzerin brachte als Inversionsmittel keine Vorteile.

In Präparaten, die neben Rohrzucker große Mengen Traubenzucker enthalten, muß letzterer erst entfernt werden. „Die Schnitte werden direkt in Schälchen mit konz., siedend-heißer Kupfersulfat-Seignettesalz-Natronlauge gebracht, so daß das Oxydationsmittel möglichst rasch und im großen Überschuß einwirken kann. Nach 1—2 Minuten ist die Glukose quantitativ oxydiert" (Hoffmeister). Das gebildete Kupferoxydul läßt sich beseitigen, indem die Schnitte nach dem Abspülen mit sehr schwacher Weinsäurelösung in eine konz. erwärmte Magnesiumchloridlösung gebracht werden. Sie werden dann nochmals mit Weinsäurelösung abgespült und dürfen jetzt bei kurzem Aufkochen in Fehlingscher Lösung keine Glykosen mehr anzeigen. Werden diese Präparate nun mit Invertinlösung und nachfolgend mit Fehling behandelt, so zeigt ein Niederschlag Rohrzucker an. Mit der Invertinmethode läßt sich, wie Kontrollversuche mit Helianthus-Mark, das mit Rohrzuckerlösuug injiziert war, ergaben, noch 0,01 % Rohrzucker nachweisen, sowie 0,5 % Rohrzucker neben 1 bis 5 % Traubenzucker.

Die im Vorstehenden angeführten Methoden verlangen eine kritische Beurteilung. Bekanntlich sind viele Glykoside mehr oder weniger leicht spaltbar. Die Spaltung wird in erster Linie bei längerem Kochen, wie es beim Saccharosenachweis mit Fehlingscher Lösung geschehen muß, erfolgen, aber auch bereits beim kurzen Aufkochen eintreten. Aus diesem Grunde vermeidet Flückiger bei seinem Verfahren ein Erwärmen. Doch selbst bei längerem Verweilen der Präparate in den stark alkalischen Reagentien bei Zimmertemperatur sind hydrolytische Spaltungen keineswegs ausgeschlossen. Somit kann das Resultat bei allen Methoden durch glykosidischen Zucker modifiziert werden. Dies dürfte zuweilen auch beim Saccharosenachweis mit der Invertinmethode eintreten, wenigstens bei Anwesenheit von durch Invertin spaltbaren Glykosiden.

---

[1]) J. Grüss, Über den Umsatz der Kohlehydrate bei der Keimung der Dattel, Ber. deutsch. bot. Ges., 1902, XX, S. 42.

Bei den Reaktionen mit Fehlingscher Lösung muß des weiteren berücksichtigt werden, daß außer Zuckerarten der Trauben- und Rohrzuckergruppe noch andere Substanzen (Amylodextrin, Hämatoxylin, Phloroglucin) das Fehlingsche Reagens reduzieren.

Zu den genannten Nachteilen kommt noch hinzu, daß sich die Niederschläge von Kupferoxydul auf längere Zeit weder in Glyzerin noch in Kanadabalsam halten, daß sich die Belegobjekte nicht als Dauerpräparate aufheben lassen.

Da bietet nun der Nachweis mit Phenylhydrazin von Senft[1]), den dieser in Anlehnung an die makrochemischen Befunde von Fischer[2]) ausarbeitete, ganz bedeutende Vorteile. Letzterer hat gezeigt, daß Zuckerarten mit überschüssigem Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung beim Erwärmen kristallinische, gelbe Körper, Osazone, liefern. Schon früher wurde Phenylhydrazin von Lidforss mikrochemisch versucht, aber ohne Erfolg. Benutzt werden mit Senft salzsaures Phenylhydrazin

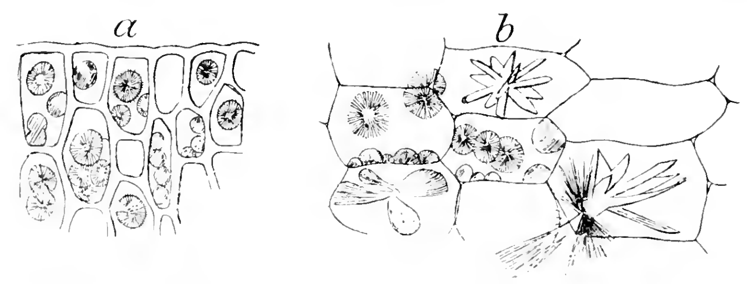


Fig. 49. Osazonkristalle mit Phenylhydrazin, *a*) Strychnos nux vomica (Endosperm). *b*) Vitis vinifera (Fruchtfleisch) (Tunmann).

und essigsaures Natron, die in Glyzerin (1 : 10) gelöst, getrennt in braunem Glase aufbewahrt werden. Die Phenylhydrazinlösung wird mit der Zeit tiefbraun, behält aber ihre Wirksamkeit, wenigstens erweisen sich fast 6 Jahr alte, häufig gebrauchte Lösungen noch völlig wirksam. Zum Nachweis wird von jeder Lösung ein Tropfen auf den Objektträger gebracht; die Tropfen werden gemischt, die Präparate eingetragen und das Deckglas aufgelegt. Anwesende Zucker scheiden sich als gelbe Osazone in Gestalt von mehr oder weniger deutlich sphärokristallinischen Kugeln oder von zu Sternen, Büscheln und Garben gruppierten Nadeln aus; seltener bilden sich derbe Spieße oder Tafeln (wetzsteinförmig). Zuweilen ist die kristallinische Natur der Ausscheidung kaum zu erkennen, es entstehen Ballen und Klumpen oder kleinkörnige Fällungen (Fig. 49).

[1]) E. Senft, Über den mikrochemischen Zuckernachweis durch essigsaures Phenylhydrazin, Sitzber. Wiener Akad., CXIII, Abt. 1, Febr. 1904.

[2]) E. Fischer, Synthesen in der Zuckergruppe, Ber. chem. Ges., 1890, XXIII, S. 2114.

Es empfiehlt sich, die Präparate zunächst ohne Anwendung von Wärme einer Dauerbeobachtung zu unterziehen. Zuerst (im Verlaufe einiger Stunden) scheidet sich Fruchtzucker aus, während Traubenzucker erst nach einem oder mehreren Tagen auskristallisiert und Rohrzucker in diesen ohne Wärme hergestellten Präparaten überhaupt nicht gefällt wird. Werden nun Präparate, die bei zweitägigem Liegen bei Zimmertemperatur keine Kristallbildungen aufweisen, auf der Asbestplatte oder auf dem Wasserbade einige Zeit erhitzt (etwa 30—40 Minuten) und erfolgt erst jetzt Kristallbildung, so ist nur Rohrzucker zugegen. Sollten bereits bei Zimmertemperatur Fällungen entstanden sein, dann zeigt sich der Rohrzucker durch Neubildung von Kristallen beim Aufkochen der Präparate an. Wendet man von vornherein Wärme an, so erfolgt die Ausscheidung weit schneller und die Kristalle sind besser ausgebildet. Doch sind hiermit nur Nachteile verbunden, denn die Kristalle treten meist aus den Zellen heraus und außerdem ist eine Unterscheidung von Frucht-, Trauben- und Rohrzucker nicht mehr möglich.

Senft hatte seine Methode zunächst an Früchten (Ceratonia, Ficus, Pirus, Phoenix, Vitis, Coffea), Blättern (Convallaria, Maranta, Crassula, Canna), Trichomen (Verbascum) und Algen erprobt (Fig. 49). Tichomirow[1]) hat später viele Pflanzen auf Zucker mit diesem Verfahren geprüft und in allen untersuchten Fällen Zucker nachweisen können. Negative Resultate erhielt er nur bei Lemna triscula und Atropa belladonna (Begründung s. S. 175, Anmerk. 2). — Das Senftsche Verfahren hat schließlich den Vorteil, daß sich die Präparate in Glyzerin-Gelatine als Dauerpräparate aufheben lassen. — In neuerer Zeit hat Riegler[2]) oxalsaures Phenylhydrazin als Glykosereagens benutzt.

Grafe[3]) führte das sekundäre asymmetrische Methylphenylhydrazin ein, welches nur mit Ketozucker, nicht mit Aldozucker ein Methylphenylosazon bildet[4]). Da aber Sorbose nur ein sirupartiges Osazon liefert, so ist Methylphenylhydrazin ein spezifisches Reagens auf Fruktose, allerdings nur bei einem Mindestgehalt von 008 %[5]).

---

[1]) W. Tichomirow, Sur la valeur de la réact. micro-chimique de la Phénylhydrazine, Ann. du Jard. de Buitenzorg, Leide, 1910, Suppl III, S. 537.

[2]) Riegler, Zuckerpr. mit oxalsaurem Phenylhydrazin, Deutsch. med. Wochenschr., 1903, XXIX, Nr. 15.

[3]) V. Grafe, Studien über den mikrochemischen Nachweis verschiedener Zuckerarten in den Pflanzengeweben mittels der Phenylhydrazinprobe, Sitzber. Wien. Akad., 1905, CXIV, Abt. 1, S. 15.

[4]) C. Neuberg, Ber. chem. Ges., 1902, XXXV, S. 959.

[5]) Das Methylphenylhydrazin muß völlig frei von Phenylhydrazin sein (bei Merck, Kahlbaum u. a. zu erhalten). Die Selbstdarstellung ist umständlich. Eine Vorschrift gibt Grafe (l. c. S. 18). Das Reagens wird 1 : 10 in Glyzerin

Es entstehen in kalt behandelten Präparaten gewöhnlich erst in 2—4 Tagen Ausscheidungen von Fruktosemethylphenylosazon (gelbe bis braune Garben, Sphärite und Schollen, die aus heißem Alkohol umkristallisiert werden können). Die Kristallbildung erfolgt schneller bei mehrstündigem Erwärmen auf 40° oder bei bis 10 Minuten langem Erhitzen auf dem Wasserbade (Fig. 50). Beim Einhalten dieser Temperaturen wird Rohrzucker nicht durch das Glyzerin invertiert. In Verbindung mit dem Senftschen Verfahren läßt sich nun einwandfrei Dextrose, Fruktose und Saccharose nachweisen.

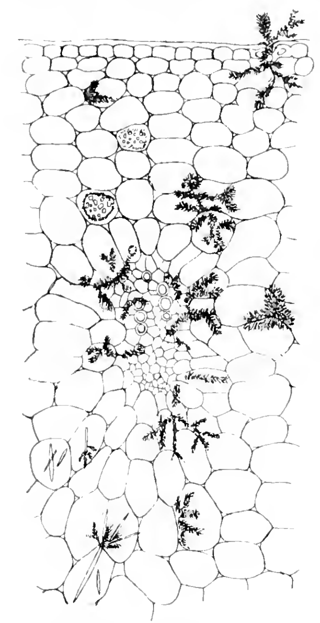


Fig. 50. Urginea maritima. Fruktosenachweis mit Methylphenylhydrazin (10 Minuten erwärmt) (Tunmann).

Bei allen Vorzügen erfordert die Phenylhydrazin-Reaktion immerhin eine kritische Beurteilung, andernfalls Irrtümer nicht ausgeschlossen sind. Senft sowohl wie Tichomirow halten die bei der Reaktion entstehenden Kristalle in den Staubfädenhaaren der Verbascumblüten für freien Zucker. Doch beweist die leichte Löslichkeit der Kristalle in verdünnten und konzentrierten Alkalien mit tiefgelber Farbe, daß es kein Zucker sein kann (vergl. Hesperidin). Da bei der Reaktion Glyzerinlösungen benutzt werden, so scheiden sich außer den Osazonen alle jene Substanzen mit aus, die in Glyzerin allein zur Ausscheidung gelangen (Hesperidin, Inulin u. a.). Auf die gelbe Farbe der Kristalle und ihre Formen ist gar kein Wert zu legen, da bekanntlich die sich ausscheidenden Substanzen Farbstoffe aus dem Gewebe und der Reagenslösung mitreißen und so, zumal wenn sie nicht ganz rein sind, gefärbt erscheinen. Es müssen somit alle bei der Phenylhydrazin-Reaktion erhaltenen Ausscheidungen in jedem einzelnen Falle genau als Osazone identifiziert werden, was bei kleinkörnigen Niederschlägen nicht immer ganz leicht ist. Nach Tichomirow sind die Osazone unlöslich in Wasser, Glyzerin, Säuren, löslich in Alkohol, schwer löslich in Chloralhydrat; sie widerstehen Alkalien und Senft benutzt 30% Kalilauge

gelöst und zwar kalt unter Umschütteln. Die Lösung wird bald dunkelrot, darf aber nur schwachen Geruch zeigen und wird wie das Senftsche Reagens mit Natriumazetat benutzt.

und 60% Chloralhydratlösung zum nachträglichen Aufhellen der Präparate; er bemerkt auch, daß die Osazone erst bei längerer Einwirkung von kaltem Alkohol gelöst werden.

An dieser Stelle sei auf das zur Untersuchung zu benutzende Material eingegangen, auf dessen Beschaffenheit man sonderbarerweise in sehr vielen Fällen wenig Gewicht gelegt hat. Handelt es sich darum lediglich „Zucker" nachzuweisen, so läßt sich sowohl frisches als auch getrocknetes, oft auch in Alkohol eingelegtes Material benutzen. Nun wollen wir aber mit unseren Methoden die nativ in den Zellen auftretenden Zucker (Trauben-, Frucht-, Rohrzucker) nachweisen und nicht glykosidisch gebundenen Zucker. Glykoside sind zum Teil leicht spaltbar und daher liefert der Nachweis des Zuckers (s. oben) bei dem längeren Kochen mit Fehling keine sicheren Resultate. Tichomirow hat bei seinen Arbeiten ganz überwiegend getrocknetes Material herangezogen. Er benutzte Phenylhydrazin und sah vom Erwärmen ab. Trotzdem läßt sich nun nicht angeben, inwieweit sich bei seinen Reaktionen glykosidische Zucker beteiligen. Denn die zahlreichen Arbeiten der Chemiker[1]) haben erwiesen, daß beim Trocknen der Pflanzen allenthalben enzymatische Spaltungen der Glykoside eintreten und auch beim schnellen Trocknen, wie es bei Herbarmaterial geschieht, nicht ausgeschlossen sind. Sogar bei Verwendung von Alkoholmaterial ist Vorsicht geboten. Werden doch in 60—70% Alkohol keineswegs alle Fermente abgetötet, so daß Glykoside sich in derart aufbewahrtem Material zersetzen können, wie Bridel[2]) beim Gentiopikrin der Wurzel von Gentiana lutea nachwies. Auf die Konzentration des zum Konservieren benutzten Alkohols wird meist wenig geachtet. Zum einwandfreien Nachweis von Frucht-, Trauben- und Rohrzucker muß somit bei jeder Methode lebendes Material benutzt werden. Für die Untersuchung auf Rohrzucker darf kein Alkoholmaterial benutzt werden, da 1 Teil Rohrzucker sich bereits in 100 Teilen 90% Alkohol löst. Enzymatische Spaltungen können übrigens beim Einlegen der Präparate in Phenylhydrazin auf ein bis zwei Monate, wie es Tichomirow machte, ebenfalls eintreten, selbst bei Benutzung lebenden Materials.

Den Zucker der Nektarien weist Knuth[3]) teils mit Fehlingscher Lösung nach, teils wendet er als Reagens Ortho-Nitrophenol-Propiolsäure an, welche Hoppe-Seyler empfohlen hatte und die bei Gegenwart von Traubenzucker eine Indigoblau-Fällung liefert. Die ganzen Blüten werden 24 Stunden in Fehling- oder in Orthonitrophenolpropiolsäure mazeriert, dann darin aufgekocht, in kaltem Wasser ausgewaschen und untersucht.

Auf einem anderen Wege sucht Molisch[4]) Zucker nachzuweisen.

[1]) Vornehmlich Bourquelot im Journ. d. Pharm. et d. Chim.

[2]) M. Bridel, Journ. de Pharm. et de Chim., 1911, 7, III, S. 534.

[3]) P. Knuth, Nachweis von Nektarien auf chemischem Wege, Bot. Zentralbl., 1898, LXXVI, S. 76.

[4]) H. Molisch, Zwei neue Zuckerreaktionen, Sitzber. Wiener Akad., 1886, XCIII, 2. Abt., S. 912.

Er fand daß Zuckerlösungen, mit einigen Tropfen einer 15—20 % alkoholischen α-Naphthollösung und Schwefelsäure versetzt, eine violette Farbenreaktion geben. Nachfolgender Wasserzusatz bedingt einen blauvioletten Niederschlag. Zuckerlösungen in gleicher Weise mit Thymol-Schwefelsäure behandelt, werden zinnoberrot. Derart lassen sich noch 0,00001 % Zucker nachweisen. Rohrzucker, Milchzucker, Traubenzucker, Fruchtzucker, Maltose geben die Reaktion, nicht aber Inosit. Auch mit Kohlehydraten und mit Glykosiden erhält man die gleichen Farbenreaktionen, doch treten sie erst nach einiger Zeit ein, nachdem die Schwefelsäure Zucker aus den Glykosiden abgespalten hat. Doch wird die Reaktion, die auf der Bildung von Furfurol beruht, auch durch Vanillin und Eiweißsubstanzen hervorgerufen (Nickel)[1]. Zur Ausführung der Reaktion bringt man nicht zu dünne Präparate auf dem Objektträger in einen Tropfen einer 15—20 % alkoholischen α-Naphthollösung und fügt 2—3 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure hinzu, so daß der Schnitt von der Säure völlig bedeckt ist. Bei Anwesenheit von Traubenzucker, Fruchtzucker, Milchzucker, Rohrzucker, Inulin wird der Schnitt augenblicklich violett. Sind aber nur Kohlehydrate oder Glykoside zugegen, deren Zucker erst durch die Schwefelsäure hydrolytisch abgespalten werden muß, dann erfolgt die Reaktion erst nach 15 Minuten. Weiteren Aufschluß liefern nun Vergleichspräparate. Man stellt zwei gleiche Schnitte her, entfernt aus dem einen durch kurzes Aufkochen in Wasser den Zucker und führt dann mit beiden Schnitten auf einem Objektträger die Reaktion aus, die jetzt in dem gekochten Schnitt viel später eintreten wird. Gegenwärtig benutzt man die Reaktion, der nur ein orientierender Wert zukommt, nur selten.

Die von Kraus[2] angegebene sogenannte „morphologische Methode", die darin besteht, daß man die zu prüfenden Objekte in Glyzerin oder Alkohol einträgt (Ausscheidung der Zuckerarten in Tröpfchen), wird man nur gelegentlich nebenbei als Hinweis berücksichtigen, falls nämlich gerade Material in konzentriertem Glyzerin oder Alkohol vorliegt. So hat Mac Dougal[3] durch Einlegen in 70 % Alkohol Rohrzuckerkörnchen in Isopyrumknollen, besonders zur winterlichen Ruheperiode aufgefunden. Glyzerin war weniger wirksam, Äther und Chloroform erwiesen sich als unbrauchbar. Die ausgeschiedenen Kügelchen waren in lebhafter Molekularbewegung. Einen sicheren Schluß gestattet diese Methode

---

[1] E. Nickel, Die Farbenreaktionen der Kohlenstoffverbindungen, vergl. ferner A. Reinbold, Über die Molisch-Udranskysche α-Naphthol-Schwefelsäure-Reaktion, Arch. ges. Ph., 1904, CIII, S. 581.

[2] G. Kraus, Über das Verhalten des Zuckersaftes der Zellen gegen Alkohol und Glyzerin und die Verbreitung des Zuckers, Bot. Ztg., 1876, XXXIV, S. 603.

[3] D. T. Mac Dougal, A contribution to the physiology of the root tubers of Isopyrum biternatum, Minnesota Botan. Studies Bull., 1896, S. 501.

nicht. Einmal gelangen unreine Zuckerlösungen, wie sie in den Pflanzen vorkommen, ungemein schwer in Glyzerin zur Abscheidung, dann ist völlig konzentriertes Glyzerin nicht immer zur Hand, da dasselbe bekanntlich sehr leicht Wasser anzieht (schon beim wiederholten Öffnen des Gefäßes). Spuren von Wasser im Glyzerin vermögen schon größere Quantitäten von Zucker in Lösung zu halten. Außerdem läßt sich eine Diagnose der ausgeschiedenen und von Zuckerarten herrührenden Tröpfchen wohl gegenüber dem Inulin und den Gerbstoffen leicht durchführen, doch bleiben wir ganz im ungewissen über andere in gleicher Form sich ausscheidende Substanzen, deren Natur uns unbekannt ist. Zur Kristallisation, die übrigens wenig beweist, kommt es nur in günstigen Fällen. Nach den makrochemischen Versuchen von Senft[1]) geben gesättigte wässerige Lösungen von Maltose und Laevulose beim Vermischen mit etwas Glyzerin selbst bei nachfolgendem Eindampfen keine Kristalle.

Schließlich sei darauf hingewiesen, daß konzentrierte Schwefelsäure bei Gegenwart von Eiweiß und Zucker Rotfärbung im Gewebe hervorruft. Es würde die Reaktion (Raspailsche[2]) Reaktion) auf Zucker deuten, sowohl auf freie Zuckerarten als auch auf gebundene. Da die gleiche Reaktion aber durch viele Alkaloide u. a. hervorgerufen wird, so berechtigt sie allein zu gar keinem sicheren Schluß.

Auch sei noch bemerkt, daß man zuweilen Zucker mit heißem Paraffin zur Abscheidung bringen kann; die Objekte werden 3 bis 5 Minuten unter Deckglas in Paraffinöl aufgekocht. Der Vorteil der Methode besteht darin, daß sich die Kristalle rein weiß in sehr großen Individuen abscheiden und zwar stets am Deckglasrande. Sie können somit isoliert und mit Phenylhydrazin weiter geprüft werden. In Betracht kommt das Verfahren, wenn braune (tief gefärbte) Pflanzenpulver vorliegen, in denen man die Osazonkristalle nur schlecht erkennen kann. Doch gelingt die Abscheidung nicht immer und als weiterer schwerwiegender Nachteil kommt hinzu, daß die Kristallisation oft mehrere Wochen beansprucht.

Inulin.

Inulin, ein Polysaccharid ($3\,(C_{12}H_{20}O_{10}) + H_2O$ [Kiliani], $6\,(C_6H_{10}O_5) + H_2O$ [Tanret]), wurde 1804 von Valentin Rose in Inula helenium entdeckt und von Thomson benannt. Mit der Mikrochemie beschäftigten sich zunächst eingehender Sachs[3]) und Kraus[4]). Es wird aus zerriebenen Dahlienknollen (Herbstmaterial) hergestellt, die man unter Zusatz von kohlensaurem Kalk auskocht. Das eingeengte Extrakt liefert beim Ausfrieren Inulin, welches durch Waschen mit Alkohol und Äther gereinigt wird. Inulin ist hygroskopisch, löslich

[1]) E. Senft, Der mikrochemische Nachweis des Zuckers, Zeitschr. d. allg. österr. Apoth. Ver., 1904, XLVIII, Nr. 13.

[2]) Raspail, Chim. organique 1839, II, S. 139.

[3]) J. Sachs, Bot. Ztg., 1864, XXII, S. 77.

[4]) G. Kraus, Bot. Ztg., 1875, XXXIII, S. 171.

in Wasser, unlöslich in Glyzerin und Alkohol, färbt sich nicht mit Jodreagentien, reduziert ammoniakalisches Silbernitrat, aber nicht Fehlingsche Lösung und gibt bei der Hydrolyse und bei Einwirkung des Enzyms Inulase (Green, Lit. s. S. 198, 2) Fruktose.

Inulin ist in der lebenden Zelle im Zellsaft gelöst, es vermag also direkt zu wandern. Es findet sich namentlich in Compositen und in den diesen nahestehenden Familien, Campanulaceen, Lobeliaceen, Goodeniaceen, Stylidiaceen, ferner in Violaceen (Jonidium ipecacuanha, bei der Bestimmung falscher Ipecacuanha diagnostisch wichtig) und in einigen Monokotylen (Leucojum, Galanthus, Allium, Hyacinthus, Narcissus). Das Inulin verschiedener Kleinia-Arten wurde von Kahns[1]) studiert. Nägeli[2]) und Cramer[3]) gaben Inulin im Zellsafte einiger Algen an (Botryophora occidentalis, Acetabularia, Polyphysa), was noch nachzuprüfen wäre. Es vertritt vollkommen die Stärke, häuft sich ebenso wie diese in den unterirdischen Reservestoffbehältern im Herbste an, um im Frühling verbraucht zu werden. So fand sich in Rad. taraxaci[4]) im Herbst 24%, im März 1,74%, in Rad. pyrethri im Herbst 57,7%, im Frühling 19% Inulin. Demgemäß schwankt der Gehalt in Drogen je nach der Zeit der Einsammlung. Rundquist[5]) gibt folgenden Prozentgehalt an: Rad. artemisiae 9,66, Rad. bardanae 46,25, Rad. carlinae 17,87, Rad. cichorii 18,50, Rad. farfarae 17,40, Rad. helenii 35,10, Rad. pyrethri germ. 26,19, Rad. pyrethri roman. 35,66, Rad. scorzonerae 31,64, Rad. taraxaci 39,65, Rhiz. arnicae 5,55. Zur Blütezeit schwindet Inulin fast ganz[6]).

Auch in den oberirdischen Teilen dieser Pflanzen trifft man Inulin an, so in Blättern (Tussilago farfara[7])), in Blütenköpfchen (Cynara scolymus). Doch führen Chlorophyllkörner, Schließzellen der Spalten, Siebröhren und Stärkescheiden nach Kraus stets Stärke. Im Samen ist Inulin mit Sicherheit nicht ermittelt worden[6]). Nach Behrens und G. Meyer[8]) soll es im Topinamburstengel in den Gefäßen vorkommen und in diesen zu den Knollen herabwandern. Die Ansicht de Candolles, nach der Helianthus tuberosus in den Tropen statt Inulin Stärke bilden soll, trifft nach Kraus[9]) wenigstens bei in Java kultivierten Pflanzen nicht zu.

In den lebenden Zellen ist Inulin nicht wahrnehmbar, da es im Zellsaft gelöst ist. Ist es aber in sehr beträchtlichen Mengen zugegen,

---

1) H. Kahns, Zur Kenntnis der physiologischen Anatomie der Gattung Kleinia, Kieler Dissertation, 1909.

2) C. Nägeli, Sitzbr. bayr. Akad., 1862.

3) C. Cramer, Denkschr. Schweiz. nat. Ges., 1887, XXX, S. 16.

4) Dragendorff, Materialien zu einer Monographie des Inulins. Petersburg, 1870.

5) C. Rundquist, Farmac. Notisblad, 1904.

6) K. Prantl, Das Inulin, München 1870.

7) W. Mitlacher, Pharm. Post, 1902, XXXV, S. 377.

8) G. Meyer, Über Inhalt und Wachstum der Topinamburknollen, Ber. d. bot. Ges., 1895, XIII, S. 184.

9) G. Kraus, Botanische Notizen, Ztschr. f. Bot., 1909, I, S. 526.

wie in den Kompositenwurzeln des Herbstes, und bringt man ein derartiges Präparat lebenden Materials unter Deckglas in einen Tropfen Wasser, dann bemerkt man größere oder kleinere, fast farblose, glänzende Tröpfchen in den Zellen auftreten, die oft ineinander fließen und sich vergrößern, bei Zusatz von neuen Wassertropfen aber wieder verschwinden. Diese Tropfen sind ausgeschiedenes Inulin, da 1 Teil Inulin ungefähr 5000 Teile Wasser zur Lösung erfordert. Inulin ist in Alkohol (selbst in 65 %) und in Glyzerin unlöslich: es gelangt daher bei Einwirkung dieser Reagentien zur Ausscheidung, sowohl beim Einlegen von Präparaten unter Deckglas als auch beim Eintragen größerer oder kleinerer Pflanzenstücke in diese Flüssigkeiten. Auch beim Trocknen der Pflanzen (bei Wasserentzug, also ebenfalls beim Gefrieren) scheidet es sich aus, so daß wir es in Herbarmaterial und in den Drogen antreffen.

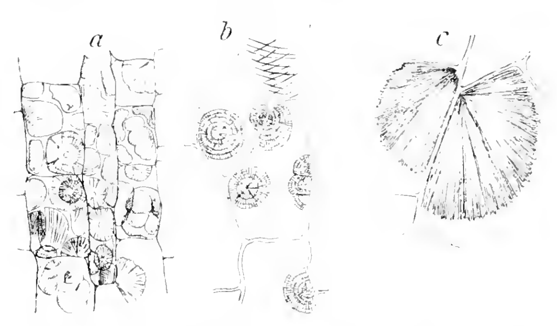


Fig. 51. Inulinausscheidungen, a) Inula helenium (Wurzeldroge), Schnitt einige Zeit in Wasser, radiale Schichtung deutlich, konzentrische selten; b) Dahlia variabilis (Knolle, Alkoholmaterial), radiale und konzentrische Schichtung gut sichtbar; c) Lappa spec. (Wurzel), Schnitt kurze Zeit in Chloralhydrat-Glyzerin, konzentrische Schichtung fehlt (Tunmann).

Legt man Präparate frischen Materials unter Deckglas in absoluten Alkohol, dann scheidet sich zuweilen das Inulin in Form eines feinen kristallinischen Mehles ab. Bringt man Pflanzenteile auf eine Woche und länger in 65—70 % Alkohol oder in Glyzerin und stellt aus diesem Material Präparate her, so finden wir das Inulin in gut ausgebildeten, den Zellwänden oft anliegenden kugeligen Sphärokristallen. Hierbei gelangt es auch an sekundäre Lagerstätten (in die Gefäße), wie es schon Prantl angibt; die Ansicht von G. Meyer[1]), nach dem Inulin hauptsächlich in den Gefäßen wandern soll, erscheint zweifelhaft. Wenigstens zeigten frische Längsschnitte von Helianthus tuberosus nur im Parenchym Inulin. Molisch fand es auch in Milchsäften. Sollten die Sphärokristalle nicht gut ausgebildet sein, dann läßt sich ein besserer Einblick durch kurze Behandlung mit alkoholischer Chloralhydratlösung gewinnen. Die Sphärokristalle lassen nun einen deutlich strahlig radialen Bau und eine konzentrische Schichtung erkennen. Trichite

[1]) G. Meyer, Beiträge zur Kenntnis des Topinamburs, Ber. d. bot. Ges., 1896, XIV, S. 347.

(feine, das Licht doppelbrechende Kristallnadeln) sind radial in konzentrische Schichten angeordnet (Fig. 51 a, b). Sie zeigen das schwarze Kreuz im polarisierten Licht und bei Einschaltung des Gipsplättchens Rot I die gleichen Additions- und Subtraktionsfarben wie die Stärkekörner (S. 50). In Drogen lassen die Sphärokristalle ihren Bau oft undeutlich hervortreten. Es rührt dieses daher, daß sich an und in dem Inulinkristall andere amorphe und in Glyzerin und in Alkohol nicht leicht lösliche Polysaccharide abgeschieden haben, welche die Trichite gewissermaßen verkitten. Diese „amorphen“ Polysaccharide[1], die das Inulin in den Zellen begleiten (s. unten), lösen sich eben bei Zusatz von Chloralhydratlösung oder von verdünnter Salpetersäure zuerst auf, so daß der strahlig radiale Aufbau schärfer hervortritt. Auch bei längerem Verweilen der Präparate in wenig Wasser erscheinen die Kristalle schärfer. Nach H. Fischer[2]) sind die Sphärite in Wasser quellbar, schmelzen aber beim Erwärmen in Wasser wie langsam lösliche Kristalle ab.

In Drogen und in Herbarmaterial findet man die Zellen oft ganz mit großen Klumpen gefüllt (besonders bei Wurzeln aus dem Herbst), die eine Vorstellung von den großen Quantitäten von Inulin geben, die die lebende Zelle in Lösung zu halten vermag. Die Lösung dieser großen Quantitäten in der lebenden Zelle muß durch andere Körper bedingt werden, nach Tunmann[3]) durch andere Polysaccharide oder durch phosphorsauren Kalk. Und Hartwich[4]) hat in der Tat schon 1904 gefunden, daß in vitro Zusatz einer Spur Pflanzenschleim zur Herstellung einer sehr stark übersättigten Inulinlösung genügt. Überwiegend bezeichnet die Literatur die glasigen Klumpen, die scharfe Kanten und einen muschligen Bruch zeigen und beim Präparieren aus den angeschnittenen Zellen oft herausfallen, als amorph. Eingehende Betrachtungen zeigen indessen, daß auch in den Klumpen das Inulin in feinen Kristallen auftritt. Hiervon kann man sich teils ohne weiteres an geeigneten Stücken überzeugen, teils bei Zusatz von

[1]) Die genaue Natur dieser Polysaccharide ist noch unbekannt. Möglicherweise handelt es sich um mehrere Substanzen (Gummi). Auch Laevulose läßt sich in Inulinzellen meist nachweisen, wenigstens fand ich mit Phenylhydrazin Laevulose in Rad. bardanae, — enulae, — pyrethri, — cichorii, — taraxaci. Beachtenswert ist ferner das gleichzeitige Vorkommen von Kalziumphosphat.

[2]) H. Fischer, Über Inulin, sein Verhalten innerhalb und außerhalb der Pflanze, Cohns Beitr., 1898, VIII, S. 53.

[3]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie des Inulins, Ber. d. pharm. Ges., 1910, XX, S. 577.

[4]) C. Hartwich, Beitr. z. Kenntnis der Ipecacuanhawurzeln, Arch. d. Pharm., 1904, CCXLII, S. 669.

Chloralhydratlösung. Es scheint, daß bei dem langsamen Wasserentzug die anderen bereits erwähnten Polysaccharide sich inniger dem auskristallisierenden Inulin anfügen und derart die kristallinische Struktur der Klumpen verdecken. — Von Bütschli wird den Sphärokristallen eine Wabenstruktur zugeschrieben. eine Ansicht, die von Puriewitsch[1]) bestätigt wird.

Inulin in größerer Menge ist in reinem kaltem Wasser (unter Deckglas) nur schwer löslich. Bei jahrelangem Aufbewahren der Präparate oder der Pflanzenteile in Alkohol wird die Löslichkeit in Wasser herabgesetzt[2]). Stets löst es sich aber beim Erwärmen in Wasser und in Glyzerin, ferner in Essigsäure, Ammoniak, Kupferoxydammoniak, Kalilauge und Mineralsäuren, und zwar in den letzten beiden Reagentien (im Gegensatz zum Hesperidin) ohne Farbenerscheinung. Jodreagentien färben nicht oder doch nur wenig hellgelb. Chlorzinkjod löst farblos. Wasserlösliche Farbstoffe färben die Ausscheidungen schwach, die Farbstoffe werden aber nicht gespeichert[3]). Sie verhalten sich in dieser Hinsicht ähnlich wie die Stärkekörner. Zur Diagnose fand ich die Färbungen nicht verwertbar. Am besten färben stark verdünnte wässerige Lösungen von Fuchsin, Safranin, Chrysoidin, Malachitgrün, Methylgrün, Jodgrün, Gentianaviolett (H. Fischer[4])).

Anlaß zur Verwechslung können bei optischer Betrachtung Kalziumphosphat, Hesperidin und harziges Sekret geben. Letzteres wird aus den schizogenen Gängen (Compositenwurzeln) bei der Präparation durch das Messer auf und in Parenchymzellen übertragen und sieht bisweilen in Gestalt dem Inulin ähnlich. Diese Sekretmassen lösen sich jedoch zum größten Teil in Alkohol, färben sich ferner mit Jodjodkalium und Chlorzinkjod meist dunkelbraunrot. Kalziumsphärite (bei Alkoholmaterial) lösen sich langsam in Wasser unter Deckglas (Durchsaugen von Wasser) und Zusatz von Schwefelsäure bewirkt braungelbe Färbung, dann Bildung von Kalziumsulfatkristallen. In vegetativen Teilen der Kompositen und Lobeliaceen können schließlich Verwechselungen mit Hesperidin unterlaufen. Hesperidinausscheidungen sind aber in heißem Wasser unlöslich und werden von Alkalien mit gelber Farbe gelöst.

---

[1]) K. Puriewitsch, Über die Wabenstruktur d. pflanz. org. Körper, Ber. bot. Ges., 1897, XV, S. 239.

[2]) H. Leitgeb, Über die durch Alkohol in Dahliaknollen hervorgerufenen Ausscheidungen, Bot. Ztg., 1887, XLV, S. 129.

[3]) H. Fischer, Stärke und Inulin, Beih. z. bot. Zentralbl., 1902, XII, S. 226.

[4]) H. Fischer, Mikrophotogr. von Inulinsphäriten u. Stärkekörnern. Ber. deutsch. bot. Ges., 1903, XXI, S. 107.

Zum Nachweis von Inulin wendet man schließlich einige Reaktionen an, die auf Bildung von Furfurol und Methylfurfurol beruhen. Nach Molisch[1]) betupft man nicht zu dünne Schnitte auf dem Objektträger mit einem Tropfen einer 15- bis 20%igen alkoholischen α-Naphthollösung, fügt dann vom Deckglasrande 2—3 Tropfen Schwefelsäure zu und erwärmt eventuell gelinde. Inulin löst sich mit violetter Farbe. Benutzt man eine 15- bis 20%ige alkoholische Thymollösung, dann entsteht eine karminrote Färbung. Green[2]) befeuchtet die Präparate mit einer alkoholischen Lösung von Orcin, legt das Deckglas auf, fügt konzentrierte Salzsäure zu und erhitzt. Hierbei löst sich Inulin mit orangeroter Farbe. Die Reaktion wurde von Meyer und Behrens für gut befunden. Wendet man eine alkoholische Phloroglucinlösung an, so tritt braunrote Lösung ein. Doch möchte ich darauf hinweisen, daß Paragalaktane (Endosperm von Lupinus) bei dieser Reaktion ebenfalls rötliche Farbenreaktionen geben. In gleicher Weise gibt Hydrochinonsalzsäure mit Inulin eine braune Färbung.

Da bei diesen Verfahren die Säuren in konzentrierter Form herangezogen werden, die teils das Gewebe sofort zerstören (Schwefelsäure), teils zu stark und zu schnell hydrolysieren, so empfiehlt Tunmann (l. c.) folgende Methode: Die Schnitte müssen einer Vorbehandlung unterworfen werden, bestehend in einer achttägigen Mazeration in Weinsäure-Alkohol (zur Entfernung der Alkaloide), in einer möglichst langen (8—10 Wochen) Mazeration in Alkohol (zur Härtung des Inulins). Sie vertragen nun ein genügend langes Auswaschen mit Wasser zur Entfernung von Zucker und Pflanzensäuren (Weinsäure[3])) und werden jetzt mit Pyrogallol- oder Resorcinsalzsäure (0,1 in 5,0 Alkohol und 5,0 konzentrierter Salzsäure) behandelt; erstere färbt bei kurzem gelinden Erwärmen violettrot, letztere zinnoberrot. Membransubstanzen, ebenso Amylum, treten beim gelinden Erwärmen in der verdünnten Säure des Reagens nicht mit in Reaktion.

Eine Anzahl dem Inulin nahestehender Polysaccharide sind in chemischer Hinsicht noch recht mangelhaft untersucht, die Ergebnisse zeigen noch wenig Übereinstimmung. Mikrochemisch sind diese Körper nicht erforscht. Zu dieser

[1]) H. Molisch, Zwei neue Zuckerreaktionen, Sitzber. Wiener Akad., 1886, XCIII, Abt. II, S. 912.

[2]) J. R. Green, On the germination of the tuber of the Jerusalem Artichoke (Helianthus tuberosus), Annals of Botany, 1889, I, S. 223.

[3]) Weinsäure und weinsaure Salze werden mit Resorcin-Schwefelsäure violettrot, aber nur beim Aufkochen und nicht bei Gegenwart von Nitraten. Laevulose wird mit Resorcinsalzsäure eosinrot; sie wird an mit Alkohol gehärteten Schnitten durch Wässern leicht entfernt, wie die Kontrolle mit Phenylhydrazin zeigt.

Gruppe zählen u. a. folgende Substanzen: Die von Tanret[1]) aus Topinamburknollen durch fraktionierte Fällung mit Baryumhydroxyd isolierten Körper, Pseudinulin (Körner), Inulenin (mikroskopische Nadeln), Helianthenin (mikroskopische Sphärite), Synanthrin (amorph). In Liliaceen kommt das von Schmiedeberg[2]) entdeckte Sinistrin vor, das mit dem Scillin von Riche und Rémont[3]) identisch sein soll und, wie A. Meyer[4]) fand, in den Liliaceen allgemein verbreitet ist und in den Blättern die Stärke vertritt. Diesem nahe verwandt oder gar identisch ist das Irisin, das Wallach[5]) im Rhizom von Iris pseudacorus, Blezinger[6]) in Iris sibirica fand. Hierher gehört ferner das Triticin der Rhizoma Graminis, welches H. Müller[7]) zuerst darstellte und beschrieb. Nach H. Keller[8]) sollen Irisin und Triticin identisch sein. In Kryptogamen und zwar in Cyanophyceen hat A. Fischer[9]) ein neues Polysaccharid als Anabänin (s. d.) beschrieben, welches ein Kondensationsprodukt des Glykogens sein soll. Die angeführten Polysaccharide vertreten die Stärke und kommen gelöst im Zellsafte vor, sammeln sich als Reservestoffe bei höheren Pflanzen in den unterirdischen Reservestoffbehältern an, um beim Eintritt der Vegetation als Baustoffe verwendet zu werden. — Dieser Hinweis soll eine mikrochemische Bearbeitung anregen.

Glykogen.

1856 entdeckten Cl. Bernard und Hensen das Glykogen der Leber. 1863 machte de Bary auf den stark lichtbrechenden Inhalt der Asci vieler Pilze aufmerksam und 5 Jahre später wurde Glykogen von Kühne in Aethalium septicum nachgewiesen. Reinke und Rodewald[10]) traten bereits für die Identität des tierischen und pflanzlichen Glykogens ein. Seit 1882 beschäftigte sich besonders Errera[11]) mit diesem Körper. Seine zahlreichen Arbeiten wurden von Massart[12]) in letzter Zeit neu herausgegeben. Das isolierte Glykogen ist ein weißes, amorphes, in Wasser leicht lösliches Pulver. Aus der wässerigen Lösung, die opaleszíert, wird es durch Barytwasser gefällt. Es reduziert Fehlingsche Lösung nicht und gibt bei der Hydrolyse und bei der Einwirkung von Enzymen (Speichel, Leber,

---

[1]) C. Tanret, Compt. rend., 1893, CXVII, S. 212.

[2]) O. Schmiedeberg, Ztschr. physiol. Chem., 1879, III, S. 112.

[3]) A. Riche u. A. Rémont, Journ. pharm. chim., 1880, II, S. 291.

[4]) A. Meyer, Bot. Ztg., 1885, XLIII, S. 490.

[5]) O. Wallach, Ber. d. chem. Ges., 1888, XXI, S. 396.

[6]) Th. Blezinger, Bot. Zentrbl., 1892, LIX, S. 279.

[7]) H. Müller, Arch. d. Pharm., 1872, CCX, S. 132 u. Journ. f. prakt. Chem., 1873, S. 832.

[8]) H. Keller, Über die Kohlenhydrate der Monokotylen, insbes. Irisin, Sinistrin, Triticin, Münster 1894 u. A. Meyer, Wiss. Drogenkunde, II, S. 46.

[9]) A. Fischer, Zelle d. Cyanophyceen, Bot. Ztg., 1905, LXIII, S. 51.

[10]) Reinke und Rodewald, Studien über das Protoplasma, 1881.

[11]) Errera, L'Epiplasme des Ascomycètes, Brüssel 1882 und Compt. rend.

[12]) L. Errera, Bibliographie du Glycogène et du Paraglykogène chez les végétaux, Rec. de l'inst. bot. de Bruxelles, 1905, I, S. 382.

Hefezellen) Traubenzucker. Unter den Abbauprodukten des Glykogens finden sich ähnliche Stoffe wie bei der Amylumhydrolyse (Maltose). Die empirische Zusammensetzung ist $C_6H_{10}O_5$ oder $6(C_6H_{10}O_5) + H_2O$ nach Clautriau[1]), welcher im getrockneten Pulver von Boletus edulis 20%, in Amanita muscaria 14%, im Pulver von Saccharomyces 31% Glykogen fand.

Glykogen ist ein bei Pilzen, bei niederen Algen (Cyanophyceen), Bakterien und Protozoen weit verbreitetes, die Stärke vertretendes Kohlehydrat. Es kommt in Zellsaftvakuolen vor. Bei Pilzen wird es aufgespeichert und zum Wachstum der Fruchtträger und zur Sporenbildung aufgebraucht[2]). In Sporen wird kein Glykogen gespeichert, wohl aber in Sklerotien. Über seine Wanderung ist noch wenig ermittelt. Bei Cyanophyceen ist es wahrscheinlich das erste nachweisbare Assimilationsprodukt. Auch in der grünen Euglenacee Colacium vesiculosum kommt es nach Errera vor, ebenso in Schwefelbakterien (Thiocystis violacea, Hinzes Amylin (s. d.) dürfte Glykogen sein). Nach Henneberg[3]) entsteht es in den Hefezellen weder aus „Eiweiß, noch aus Pepton oder Fett", Glykogenvakuolen sollen nicht existieren, „das Glykogen durchsetzt das Eiweiß".

In den lebenden Zellen bildet das Glykogen eine farblose, stark lichtbrechende Substanz, die sich mit Jodjodkaliumlösung leuchtend rotbraun färbt. Die Intensität der Färbung ist um so stärker, je mehr Glykogen zugegen ist. Bei Anwesenheit von Spuren erhält man nur eine braune, orange oder selbst gelbe Färbung. Man kann, wie L. Errera[4]) zeigte, aus der Intensität der Reaktion auf die Menge des anwesenden Glykogens schließen, doch muß man dann stets die gleiche Jodlösung benutzen (0,1 Jod, 0,3 Jodjodkalium, 45,0 Wasser). Selbstverständlich müssen die Präparate bei derartigen Vergleichsversuchen direkt in das Reagens gelegt werden. Benutzt man stärkere Jodlösungen, dann werden auch Spuren von Glykogen intensiver gefärbt. Hat man auf ein in Jodjodkaliumlösung liegendes Präparat Wasser einwirken lassen und zerdrückt man dann die Zellen, so daß

[1]) C. Clautriau, Mém. de l'Acad. royal. de Belgique, 1895, LIII und: Étude chim. du glycogène chez les champignons et les levures, Brüssel, F. Hayez, 1895, u.: Creighton, Microscop. researches of the formative property of glycogen, London 1896.

[2]) Eine abweichende Angabe macht Ch. Ternetz, die bei Ascophanus carneus selbst nach zweimonatlichem Hungern keine Abnahme der äußerst geringen Mengen von Glykogen beobachtete (Protoplasmabewegung und Fruchtkörperbildung bei A. c. Pers., Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, XXXV, S. 277). Bei diesem Pilze fanden sich Körnchen, die eine Eigenbewegung besitzen, weder Gerbstoff- noch Jodreaktionen geben, aber Kernfarbstoffe speichern.

[3]) W. Henneberg, Neuere Unters. über Eiweiß-, Glykogen- und Fetthefezellen, Verh. 83. Nat. Vers. Karlsruhe, 1911, II, 1, S. 240.

[4]) L. Errera, Über den Nachweis des Glykogens bei Pilzen, Bot. Ztg., 1886, XLIV, S. 316 und: Sur le glycogène chez les Basidiomycètes, Mém. de l'Acad. d. Belg., 1885, XXXVII.

die rotbraunen Massen ins Wasser gelangen, so kann man ihr Auflösen im Wasser verfolgen. Mit der Stärke teilt Glykogen die Eigenschaft, daß die Jodfärbung beim Erwärmen verschwindet, um beim Erkalten wieder sichtbar zu werden. Doch muß man, um ein Auflösen zu verhindern, vorsichtig auf 50—60° erwärmen. Bisher ist es noch nicht gelungen, die Jodfärbung des Glykogens (von der es noch fraglich ist, ob sie auf chemischen Vorgängen beruht) haltbar zu machen.

Auf die Gerinnungsfähigkeit des Glykogens hat A. Fischer[1]) den sichersten mikrochemischen Nachweis gegründet. Das Material wird in Alkohol fixiert, die Mikrotomschnitte kommen in Xylol, dann in Alkohol und schließlich ohne den anhaftenden Alkohol zu entfernen in eine 10%ige wässerige Tanninlösung. Nachdem die Präparate 10—15 Minuten lang in der Tanninlösung gelegen haben, werden sie zunächst wiederum ohne Abspülung in 1%, dann in eine 10%ige wässerige Lösung von doppelchromsaurem Kali gebracht. Auch hierin bleiben sie etwa 10 Minuten. Auf diese Weise ist das Glykogen gänzlich unlöslich in Wasser geworden. Es kann nun mit basischen Farbstoffen (Safranin, Bismarckbraun, Jodgrün, Methylenblau) gefärbt werden, wird von Safranin leuchtend rot und zeigt die Form, welche es bei der Fixierung mit Alkohol hatte. Zellkerne bleiben hierbei infolge der Tanninbehandlung ungefärbt oder erscheinen durch die Chrombehandlung nur schwach gelblich. Gute Färbungen erhält man mit 10 Minuten langem Färben mit Safranin-Anilinwasser. — Die in der tierischen Histologie benutzten Färbungsmethoden von Vastarini, Best und P. Mayer sind, wie es scheint, auf unserem Gebiete noch nicht erprobt worden. Mayer[2]) sagt auch, daß das Gallein (Grübler) „unter Zusatz von Ammoniak in 70% Alkohol gelöst, eine sehr präzise Färbung des Glykogens gibt, und zwar ziemlich lebhaft violett“.

Als Hilfsreaktion wird man schließlich Färbungen mit Rutheniumrot heranziehen können, denn Tobler[3]) fand, daß sich sowohl reines Glykogen (Schuchhardt-Görlitz) als auch Glykogen in verschiedenen Präparaten intensiv mit diesem Farbstoffe färbt.

---

[1]) A. Fischer, Eine neue Glykogenfärbung, Anatom. Anzeiger, 1905, XXVI, S. 399.

[3]) P. Mayer, Zur Färbung des Glykogens, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 513.

[2]) F. Tobler, Über die Brauchbarkeit von Mangins Rutheniumrot als Reagens für Pektinstoffe, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1906, XXIII, S. 182.

2. Iso- und heterocyklische Verbindungen.

Brenzcatechin.

Brenzcatechin (Orthodioxybenzol, Pyrocatechusäure, Catechol) kristallisiert bei der Sublimation in rhombischen Blättchen, aus Lösungen in kurzen Säulen, löst sich leicht in Wasser, Alkohol und Äther, auch in Chloroform, wird mit Alkalien grün, dann braun, schließlich schwarz, mit Eisenchlorid grün, bei nachfolgendem Zusatz von Natriumkarbonat oder Ammoniak violett. Mit Brom bildet sich Tetrabrombrenzcatechin. Brenzcatechin findet sich in den Herbstblättern von Ampelopsis hederacea (Gorup), doch nach Weevers nur in Spuren, ferner in Salix helix, S. alba, S. vitellina, Populus alba, P. monilifera; es ist als Endprodukt der Spaltung von Salicin im Gewebe der Salixarten zugegen und dient wieder zum Aufbau dieses Glykosides. Kurz nach dem Austreiben der Knospen steigt der Gehalt an Brenzcatechin. Die bei der Nekrobiose erfolgende Schwarzfärbung der Salixblätter beruht auf Catechol[1]). In größerer Menge entsteht es bei der trockenen Destillation von Kino, Catechu u. a. Harzen.



Fig. 52. Brenzcatechin, Sublimat des Ätherauszuges von Salixknospen (Tunmann).

Weevers[2]) wies Brenzcatechin mit Eisenchlorid und Sodalösung nach. „Die Schnitte wurden in verdünnte Ferrichloridlösung gelegt, nach einigen Minuten abgespült und eine ziemlich konzentrierte Natriumhydrokarbonatlösung hinzugefügt.“ Um Enzymwirkungen auszuschalten, wird das lebende Material (Blätter, Äste) mit kochendem Alkohol oder kochendem Wasser behandelt. Brenzcatechin läßt sich mit Äther ausziehen. Der Rückstand des Auszuges zeigt Kristalle, die mit Eisenchlorid blaugrün, mit Bromwasser schmutzig rosafarbig werden. „Gebrannter Kalk gibt in konzentrierter erwärmter Lösung einen starken Niederschlag prachtvoll polarisierender Stäbchen mit gerader Auslöschung, meistens sternförmig geordnet und von hellgelber Färbung.“ Brenzcatechin reduziert Silbernitrat in der Kälte und sublimiert leicht.

Die Sublimation hat Weevers zu vergleichenden quantitativen Bestimmungen nutzbar gemacht. Das Material wird mit Äther ausgezogen, der Auszug vom Äther befreit, der Rückstand in absolutem Alkohol aufgenommen, die alkoholische Lösung wird ev. eingeengt.

---

[1]) Th. Weevers, Betrachtungen u. Unters. üb. d. Nekrobiose und d. letale Chloroformeinwirkung, Rec. d. trav. bot. Néerland., 1912, IX, S. 279.

[2]) Th. Weevers, Die physiologische Bedeutung einiger Glykoside, Jahrb. f. wiss. Bot., 1904, XXXIX, S. 229.

Die konzentrierte Lösung wird mit Hilfe des Wysmanschen kupfernen Täfelchens sublimiert, da alkoholische Lösungen beim Erhitzen breit fließen. Die Kupfertafel hat eine Öffnung (1 cm groß) auf die ein Glimmerplättchen nebst Asbestring kommt. Die Kupferplatte wird vorgewärmt, die Lösung tropfenweise in den Asbestraum der Glimmerplatte gebracht und dann wird auch die Glimmerplatte erwärmt. Derart verdampft die Lösung langsam. Nun wird ein Objektträger auf den Asbestring aufgelegt und weiter erwärmt. Die erhaltenen Sublimate werden (Fig. 52) mit Sublimaten von bestimmtem Gehalt verglichen. Das Verfahren gestattet „eine Genauigkeit bis auf Milligramme". — Über die direkte Sublimation aus Pflanzen liegen, wie es scheint, keine Erfahrungen vor. Bei höherer Temperatur (200°) würde Protocatechusäure (S. 208) nebst Derivaten ebenfalls Brenzcatechin liefern.

Benzoesäure.

Benzoesäure (Phenylameisensäure), überwiegend ein Bestandteil pflanzlicher Sekrete (Siambenzoe bis zu 25 %, Tolubalsam, Akaroidharz, Perubalsam, Styrax, Myrrha, Ylang-Ylang-Öl von Cananga), tritt teils frei, teils in Gestalt von Estern auf. Sie wird angegeben für Salvia sclarea (Braconnot), Asperula odorata, Holcus odoratus (Vogel), Ceratonia siliqua (Grünzweig). In der Preißelbeere fand sie O. Loew (bis zu 0,5 % in getrockneten Früchten, Mason, Kanger), hier erfolgt bei der Reife ein Ansteigen des Benzoesäuregehaltes. In geringer Menge wurde sie von Nestler in der Moosbeere (Vaccinium oxycoccus L.) ermittelt. (Im Tierreich fand sie Wöhler im Castoreum). Möglicherweise bildet die Benzoesäure in den Früchten einen Schutz gegen gewisse Pilze. In Pinguicula vulgaris schützt sie die gefangenen Insekten vor Fäulnis (O. Loew u. K. Aso, 1907).

Trotzdem die Sublimationsfähigkeit der Benzoesäure seit Anfang des 17. Jahrhunderts bekannt ist, wurde diese Eigenschaft erst 300 Jahre später zum mikrochemischen Nachweis in pflanzlichen Geweben von Nestler[1]) herangezogen. Der Rezipient ist während der Sublimation durch Wassertropfen zu kühlen (Verfahren S. 24, Fig. 7), das Sublimat ist sofort mikroskopisch zu prüfen, da zarte Beschläge bei Zimmertemperatur nach wenigen Stunden, starke Beschläge nach mehreren Tagen, vollständig verdunsten. Die heraussublimierten Kristalle sind schief rhombische Prismen (monoklin), die unter Deckglas in kaltem Wasser sich nur langsam lösen (in 470 Teilen), aber leicht löslich sind in Alkohol, Äther und Chloroform. Aus diesen Lösungen scheidet sich die Benzoesäure beim Verdunsten des Lösungsmittels in charakteristischer Form wieder aus. Löst man die Kristalle in verdünnter

---

[1]) A. Nestler, Ein einfaches Verfahren zum Nachweise der Benzoesäure in der Preißelbeere und Moosbeere, Ber. d. bot. Ges., 1909, XXVII, S. 63.

Natronlauge ($^{n}/_{10}$), dann scheiden sich auf Zusatz eines kleinen Tropfens Salzsäure (spez. Gew. 1,092) sofort langgestreckte Kristallfelder ab, „die aus vielen annähernd in gleicher Richtung aneinandergereihten rektangulären Lamellen bestehen“ (Haushofer)[1]. Die Kristalle der Benzoesäure lösen sich in Ammoniak; die ammoniakalische Lösung gibt nach dem Eintrocknen auf Zusatz von verdünnter Eisenchloridlösung einen roten Niederschlag (Ferribenzoat). Die verdünnte Lösung eines benzoesauren Salzes (benzoesaures Natrium) gibt mit Silbernitrat charakteristische Kristalle von Silberbenzoat (sehr dünne, gerade auslöschende Lamellen und scharfkantige Prismen (Fig. 53b). Sie können mit heißem Wasser umkristallisiert werden. Aus Lösungen von freier Benzoesäure scheidet sich Silberbenzoat auf Zusatz von Silbernitrat und Natriumazetat aus.

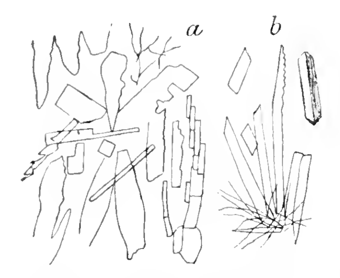


Fig. 53. Benzoesäure: a) Kristallformen im Sublimat von Vaccinium myrtillus, bei b) in benzoesaures Silber übergeführt (Tunmann).

Mit Hilfe der direkten Sublimation wies Nestler Benzoesäure nach in Preißelbeeren (Fig. 53a), Moosbeeren, Benzoeharz und Tolubalsam. Zum Nachweis genügt eine einzige getrocknete Preißelbeere, die etwa 0,0001 g Benzoesäure führt. In der Preißelbeere ist die Benzoesäure in der Wachsschicht enthalten, denn wenn man das Wachs in Äther löst (durch ganz flüchtiges Übergießen der Früchte mit Äther), so erhält man aus dem Ätherrückstand Benzoesäuresublimate. Es fragt sich aber, ob die Säure in das Wachs nicht erst beim Trockenprozeß gelangt ist. Sie läßt sich ferner durch direkte Sublimation ermitteln in der Epidermis (der vom Wachs befreiten Früchte) und im Fruchtfleisch, im Samen aber erst in dem Ätherauszuge von etwa 50 zerkleinerten Samen.

Bei Pinguicula vulgaris legt Marpmann[2]) auf eine Glimmerplatte von 30×80 mm Größe und 0,2—0,3 mm Dicke einen Metallring von 15 mm Höhe und 15—20 mm Durchmesser, füllt die zerriebene Substanz ein, bedeckt mit dem Objektträger, stellt die beschickte Glimmerplatte auf eine Metallplatte und erwärmt. Marpmann meint, daß man bei Benutzung eines heizbaren Objekttisches die Sublimation unter dem Mikroskop verfolgen kann. Da Benzoesäure sehr leicht flüchtig ist, so wären Versuche in dieser Hinsicht nur zu empfehlen.

Auch bei der Sublimation einer Spur Perubalsam oder Styrax auf

[1]) K. Haushofer, Mikroskopische Reaktionen, Braunschweig 1885, S. 72.

[2]) G. Marpmann, Über Befunde von Benzoesäure in Pinguicula vulgaris, Ztschr. f. angew. Mikr., 1908, XIV, S. 1.

der Asbestplatte erhalten wir besonders in den ersten Sublimaten Benzoesäure und Ester derselben, während die, bei höherer Temperatur gewonnenen, letzten Sublimate Zimtsäure (s. d.) führen. In den bei höherer Temperatur gewonnenen Sublimaten der Cocablätter trifft man zuweilen ebenfalls Benzoesäure an.

Tyrosin (und Homogentisinsäure).

Tyrosin (Paraoxyphenylalanin), ein weit verbreiteter Baustoff der pflanzlichen Eiweißkörper, findet sich auch im Tierreich (Käse, Milz, Pankreasdrüse). Es bildet feine Nadeln, die zu Garben vereinigt sind, sich schwer in kaltem Wasser, leicht in heißem Wasser und in Alkalien, nicht in Alkohol und in Äther lösen. Tyrosin ist aufgefunden in Kartoffeln (Schulze), in Apium (Bamberger), in der Zuckerrübe (von Lippmann), in Knollen von Dahlia (Leitgeb) und Stachys tuberifera (Planta), in Schößlingen japanischer Bambusen (Shibata), im Safte der Holunderbeeren (Tollens), in Trifolium (Orloff), in Keimlingen (mikrochemische Versuchsobjekte) von Lupinus, Vicia, Cucurbita u. a. Es tritt vorzugsweise in den ersten Keimungsstadien auf, wird aber bald durch die Tyrosinase, die am Wurzelhals und in den basalen Teilen des Hypokotyls ihren Sitz hat, weiter verändert. Hierbei entsteht unter Sauerstoffaufnahme und unter Ammoniakabspaltung stickstofffreie Homogentisinsäure, (Gonnermann, Bertel), die in weitere Oxydationsprodukte übergeht. Aus den Samenproteiden wird es in einer Ausbeute bis zu 3 % erhalten. Tyrosin kommt auch in Pilzen vor (Basidiomyceten, Secale cornutum). Verschiedentlich wurde es in den Membranen angegeben, in neuerer Zeit noch von Saito (s. Zellmembran). Bei Fäulnisprozessen wird es zersetzt; die Schwarzfärbung der Bohnenhülsen soll auf Tyrosinoxydation beruhen (Bourquelot).

Der mikrochemische Nachweis des Tyrosins ist leichter zu erbringen, als der anderer Amidokörper. Man legt die aus frischem Material hergestellten Schnitte auf dem Objektträger in einige Tropfen Alkohol; nach dem Verdunsten des Alkohols scheidet sich Tyrosin in feinen doppelbrechenden Nadeln aus, die zu Garben und Büscheln vereinigt sind (Borodin)[1], sowie oft in Doppelpinselform auftreten[2]. Die sich hierbei in verschiedenen Objekten gleichzeitig bildenden Kristalle von Asparagin (S. 176), Kaliumnitrat (S. 85), Leucin (S. 174) sind niemals Nadeln sondern Blättchen. Diese Blättchen lösen sich überdies sehr leicht in Wasser, ebenso die in Nadeln sich abscheidenden Glutaminkristalle (S. 179) in Cucurbita, sowie Mannitkristalle (S. 131).

---

[1]) Borodin, Üb. d. phys. Rolle u. die Verbr. d. Asparagins im Pflanzenreiche, Bot. Ztg., 1878, XXXV, S. 816, u. Über einige b. Bearbeit. v. Pflanzenschnitten mit Alkohol entstehende Niederschl., Bot. Ztg., 1882, XXXIX, S. 591.

[2]) K. Shibata, Beiträge zur Wachstumsgeschichte der Bambusgewächse, Journ. College of Sci. Tokyo, 1900, XIII, S. 427.

Setzt man ammoniakhaltigen Alkohol (1,0 Ammoniak, 10,0 Alkohol) zu, dann gehen Tyrosinkristalle in Lösung, um sich bald in Garben wieder auszuscheiden. Sie lösen sich in Millons Reagens mit tiefroter Farbe (Nasse[1]), ebenso verhalten sich alle Eiweiß-Substanzen [s. d.], die Tyrosin enthalten) und geben die Xanthoproteinreaktion. Bei vorsichtigem Eindampfen mit Salpetersäure entsteht ein gelber Rückstand, der bei Zusatz von Natronlauge eine gelbrötliche Lösung bildet, aus der sich rote, undeutlich kristallinische Massen abscheiden.

In den Präparaten lassen sich noch folgende Reaktionen benutzen. Beim Erwärmen der Kristalle mit Formalin-Schwefelsäure erfolgt Grünfärbung (Mörner)[2]). Auch Froehdes Reagens (eine durch Erwärmen frisch bereitete Lösung von 0,01 g molybdänsaurem Natrium in 1,0 ccm konz. Schwefelsäure) habe ich brauchbar gefunden: es löst die Kristalle mit tiefblauer Farbe, die bald violett wird. Umständlicher, aber schärfer (Empfindlichkeitsgrenze 0,01 μg) ist Azetaldehyd-Schwefelsäure (rosa bis rote Färbung). Die alkoholische Tyrosinlösung wird mit einem Tropfen Schwefelsäure und mit zwei kleinen Tropfen Azetaldehyd (5 ccm : 10 ccm Alkohol) versetzt. Aus frischen Präparaten, die einige Tage unter Deckglas in wenig Glyzerin gelegen haben, kristallisiert Tyrosin ebenfalls aus. Es häuft sich in einigen Zellen des Gewebes an (mit Garben und Büschel erfüllte Zellkomplexe). Nach Leitgeb[3]) soll Inulin das Auskristallisieren des Tyrosins in Dahliaknollen verhindern können. In solchen Fällen lassen sich Tyrosinkristalle erzielen, wenn man in ein kleines Präparatengläschen ein, den Raum des Gläschens annähernd ausfüllendes, mindestens 0,5 cm hohes Stück der Dahliaknollen stellt und das Gläschen zur Hälfte mit Alkohol füllt. Auf der oberen aus dem Alkohol hervorragenden Schnittfläche sammelt sich Tyrosin in großen Kristallen an, die nach den oben angegebenen Methoden identifiziert werden können.

In, einige Tage alten, Keimlingen (Lupinus luteus u. a.) lassen sich Tyrosinkristalle durch Asphyxie erzeugen (Bertel)[4]). In Wurzel und Hypokotyl erfüllen die bis 10 μ großen, schwach doppelbrechenden, gelblich-weißen Sphärite die Zellen stellenweise völlig. Die Tyrosinregion reicht ununterbrochen vom Hypokotyl bis an die Wachstumszone der Wurzel. Die Wurzelhaube ist frei von Tyrosin, hingegen

---

[1]) O. Nasse, Pflüg. Archiv, 1901, LXXXIII, S. 361.

[2]) Mörner, Ztschr. f. physiol. Chem., 1902, XXXVII, S. 86.

[3]) H. Leitgeb, Der Gehalt d. Dahliaknollen an Asparagin und Tyrosin, Mitt. bot. Inst. Graz, 1888, I, S. 215.

[4]) E. Bertel, Über Tyrosinabbau in Keimpflanzen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1902, XX, S. 454.

finden sich große Mengen in der Plumula. Die Tyrosinabscheidung läßt sich an Präparaten hervorrufen durch Chloroform, Benzol, Toluol, Alkohol und Äther. Man bringt Schnitte aus der mittleren Wurzelregion auf dem Objektträger in einen Tropfen Wasser, legt einen Papp-ausschnitt als feuchte Kammer auf (S. 15) und bringt auf das Deckglas einen Tropfen Chloroform, Äther oder dergl. Die Dämpfe des hängenden Chloroformtropfens müssen die Schnitte bestreichen. Nach 30—60 Minuten haben sich nadelförmige, kranzartig gruppierte Tyrosinkristalle gebildet. Durch die Narkose wird jedenfalls die weitere Verarbeitung des Tyrosins verhindert, während die Wirkung proteolytischer, Tyrosin bildender Enzyme nicht gehemmt wird.

In den Tyrosinzellen der Keimwurzeln tritt mit ammoniakalischer Silbernitratlösung keine Reduktion ein, doch erfolgt die Millonsche Reaktion. Wird jedoch die Narkose auf mehrere Tage ausgedehnt, dann verschwinden die Kristalle, die Millonsche Reaktion bleibt aus und die Silberreduktion tritt, besonders beim Erwärmen, deutlich hervor. Der die Reduktion bedingende Körper, der sich vornehmlich im Periblem findet, soll nach Czapeks[1]) eingehender Untersuchung Homogentisinsäure sein, die sich aus Tyrosin bildet. Wahrscheinlich deutet die Beobachtung von Pfeffer[2]), daß Wasserstoffsuperoxyd (neutral oder ganz schwach alkalisch) eine rötlichbraune Färbung hervorruft (Keimwurzel von Vicia faba), ebenfalls auf Homogentisinsäure hin.

Czapek weist Homogentisinsäure in Lupinenwurzeln nach, indem er eine größere Menge Wurzeln zunächst in einem geschlossenen Glase mehrere Tage im Brutschrank beläßt. Dann werden die Wurzeln unter Zusatz von Glaspulver zerrieben, der Wurzelbrei wird mit 96 % Alkohol ausgekocht. Das alkoholische Extrakt wird eingeengt, mit Wasser verdünnt, der Alkohol verjagt und die wässerige Lösung filtriert. Die Lösung enthält die Homogentisinsäure, sie wird mit Alkalien rötlichgelb bis dunkelbraun, reduziert ammoniakalische Silberlösung, wird beim Erwärmen mit Millons Reagens gelbrötlich, mit Eisenchlorid grünlich, mit Eisenvitriol violett. Sie wird durch Bleiacetat gefällt, Fehlingsche Lösung wird erst bei längerem Kochen etwas reduziert. Reine Homogentisinsäure gibt ähnliche Reaktionen. — Da aber Schulze und Castoro[3]) Homogentisinsäure nicht isolieren konnten, trotzdem sich diese, künstlich den Pflanzen zugesetzt, noch in Spuren von 0,005 % nachweisen läßt, so bleibt die Frage strittig.

---

[1]) Fr. Czapek, Oxydative Stoffwechselvorgänge bei pflanzlichen Reizreaktionen, Ztschr. f. wiss. Bot., 1906, XLIII, S. 361.

[2]) W. Pfeffer, Beiträge zur Kenntnis der Oxydationsvorgänge in lebenden Zellen, Leipzig, 1889, S. 8.

[3]) E. Schulze u. N. Castoro, Bildet sich die Homogentisinsäure beim Abbau des Tyrosins in den Keimpflanzen?, Ztschr. f. phys. Chem., 1906, XLVIII, S. 396.

Protocatechusäure.

Protocatechusäure (3—4-Dioxybenzoesäure) entsteht aus vielen Harzen (Kino, Benzoe, Akaroid, Myrrha u. a.) bei der Kalischmelze, findet sich in den Früchten von Illicium verum (Oswald) und religiosum (Eykman), sowie in den Blättern von Vitis vinifera (Boettinger). In reinem Zustande kristallisiert sie in gelblichen Nadeln, die bei 199° schmelzen, bei höherer Temperatur in Kohlensäure und Brenzcatechin zerfallen.

Angaben über die Mikrochemie der Protocatechusäure fehlen in der Literatur. Man wird bei Illicium-Früchten die Sublimation heranziehen. Doch ist es notwendig, etwas mehr Substanz (0,08—0,1 g Pulver) auf einmal zu verarbeiten. Außerdem ist es vorteihaft, das Pulver auf dem Glase zuvor mit 2—3 Tropfen Wasser gut zu durchfeuchten. Die Höhe des Flammenkegels beträgt 4 cm, die Spitze der Flamme soll die Asbestplatte berühren. Die ersten Sublimate enthalten naturgemäß reichlich Wassertropfen, vermischt mit fettem Öle, welches zuweilen kristallinisch erstarrt. Bereits im 3. Sublimat, mehr in den folgenden, treffen wir zahlreiche Kristalle an. Die Kristalle entstehen meist nach kurzer Zeit, vereinzelt erst nach einigen Stunden, sind von hyaliner Beschaffenheit, anfangs rein weiß, später gelblich und verflüchtigen sich selbst nach Monaten nicht an der Luft bei 20—30° (Unterschied von Sublimaten der Benzoesäure). Die Kristalle sind recht charakteristisch tannenbaum- und gitterartig angeordnet, meist kleine Nadeln und Blättchen. Letztere sind zu herzförmigen und federartigen Gebilden vereint (Fig. 54). Diese Kristalle finden sich in den Sublimaten, die bei mikroskopischer Betrachtung weiß oder doch nur gelblich erscheinen (s. auch Shikimisäure), lösen sich in Wasser, Alkohol und Äther. In verdünntem Eisenchlorid (1 : 10) bilden sich teils sofort grünschwarze schaumige Tropfen, teils läßt sich am Rande des Tropfens eine gelbe, dann rote und schnell dunkelgrün werdende Färbung feststellen. Man läßt eintrocknen und bringt seitwärts einen Tropfen Sodalösung (1 : 20), den man mit der Nadel mit dem eingetrockneten Rückstand verbindet. Derart läßt sich unter dem Mikroskop der Übergang der grünen Färbung in Blau, schließlich in Braunrot verfolgen. Ammoniak löst farblos und gibt einen annähernd farblosen Rückstand, Brenzcatechin fehlt. Wahrscheinlich sublimiert die Protocatechusäure vollständig heraus, ehe die zur Spaltung nötige Temperatur erreicht ist. Brenzcatechin gibt ebenso wie Protocatechu-

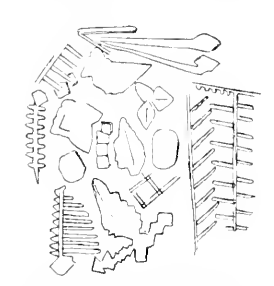


Fig. 54. Protocatechusäure. Kristalle im Mikrosublimat der Illiciumfrüchte (Tunmann).

säure, Kaffeesäure und Chlorogensäure die Reaktion mit Eisenchlorid-Soda. Kaffeesäure löst sich schwer in Wasser; Chlorogensäure ist in Äther nach Gorter unlöslich. Protocatechusäure scheint in Illicium vornehmlich in den äußeren Zellreihen der Karpelle lokalisiert zu sein.

Ellagsäure.

Ellagsäure bildet hellgelbe, in Wasser und in Alkohol unter Deckglas unlösliche Kriställchen, die sich in nitrithaltiger Salpetersäure blutrot lösen. Die alkalischen Lösungen sind gelb, nach einiger Zeit rot; Eisenchlorid färbt dunkelblau. In kleiner Menge ist Ellagsäure in Galläpfeln und in gerbstoffhaltigen Rinden (Punica granatum, Potentilla tormentilla, Quercus) aufgefunden.

Eingehende mikrochemische Untersuchungen liegen nicht vor; nur Gibelli[1]) hat Ellagsäure im kristallinischen Zustande im Gewebe erkrankter Kastanien (Stamm und Wurzel) angegeben. Die ausgeschiedenen Sphärokristalle lösten sich in Wasser und Alkalien, in Kaliumkarbonatlösung mit gelber, in Salpetersäure mit granatroter Farbe und wurden mit salpetersaurem Silber rotbraun, mit Eisenchlorid grünschwarz. Sie fanden sich im Bast, im Phelloderm, bisweilen im Holzparenchym und in der Nähe der größeren Gefäße.

Chinasäure.

Die Chinasäure (Tetraoxy-Hexahydrobenzoesäure) tritt allgemein in Hydrochinon oder Arbutin führenden Ericaceen auf, in größerer Menge (5—8 %) in Cinchonen; in den Cinchonen sind die Alkaloide an Chinasäure gebunden. Die Säure ist für niedere Pflanzen nach Nägeli und Czapek eine vorzügliche Kohlenstoffquelle, die Traubenzucker zu ersetzen vermag. In reinem Zustande kristallisiert sie in farblosen Prismen.

Reine Chinasäure läßt sich am Objektträger aus Wasser oder Alkohol nur schwierig umkristallisieren, die Kristalle entstehen an der Luft erst nach einigen Tagen und überwiegend in Zerrformen. Bei der Sublimation erhält man mattglänzende Sublimate, die sofort kristallinisch werden. Die Kristalle lösen sich in Wasser, 80 % Alkohol, sowie in Ammoniak und Eisenchlorid. Farbenerscheinungen lassen sich bei den Lösungen nicht beobachten, wenigstens nicht in den farblosen Sublimaten. Die Kristalle verflüchtigen sich nicht bei längerem Liegen der Präparate an der Luft. Die bei sehr starkem Erhitzen der Chinasäure auftretenden Spaltlinge: Hydrochinon, Brenzkatechin, Benzoesäure u. a. sind in den Sublimaten nicht zugegen. Die Sublimate be-

[1]) G. Gibelli, Nuovi studi sulla malattia del Castagno, Bologna, 1883, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, S. 137.

stehen aus Chinasäure: wahrscheinlich ist Chinid ebenfalls zugegen. Reine Chinasäure als auch die Sublimate geben mit Kalkwasser in sehr kurzer Zeit typische Kristallformen, die jedenfalls chinasaures Kalzium darstellen (Fig. 55e). Bei der Sublimation von Chinarinde erhalten wir in den farblosen und ganz schwach rosa gefärbten Sublimaten (s. Cinchona-Alkaloide) analoge Kristalle. Die außerhalb der zierlichen Figuren auftretenden scharfkantigen größeren Kristalle scheinen Chinasäure zu sein (Fig. 55a), zumal sie sich unter Deckglas nicht in Äther oder Chloroform lösen. Es ist beachtenswert, daß die Säure gleichzeitig mit den Alkaloiden sublimiert, so daß es nicht ausgeschlossen ist, daß im Sublimat ein Teil der Alkaloide als chinasaure Salze vorliegt.

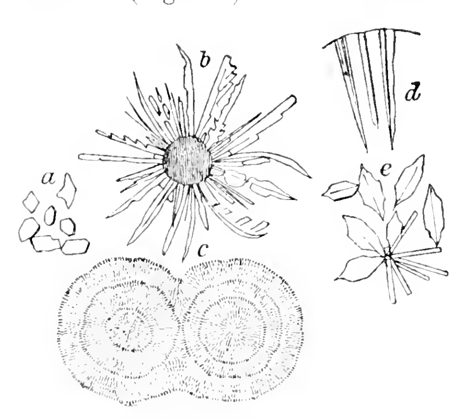


Fig. 55. *a*, *b*, *c* Kristallformen im Sublimat von Cinchona calisaya (Rindenpulver); *a*) wahrscheinlich Chinasäure, *b*) und *c*) überwiegend Alkaloide; im Sublimat mit Wasser (*d*) und mit Kalkwasser (*e*) erhaltene Kristalle von Chinasäure (?) (Tunmann).

Shikimisäure.

Shikimisäure (Trioxycyklohexenkarbonsäure) ist in den Früchten von Illicium religiosum und Ill. verum aufgefunden. Im isolierten Zustande bildet sie feine farblose, bei 184° schmelzende Nadeln.

Angaben über den mikrochemischen Nachweis der Shikimisäure fehlen. Wir können mit Erfolg die Mikrosublimation benutzen und sublimieren in der S. 27 angegebenen Weise einige Zentigramm durchfeuchteten Pulvers der Illiciumfrüchte. Die Sublimation gelingt auch bei Verarbeitung mehrerer Schnitte. Die ersten Sublimate führen ätherisches Öl und Spuren von Protokatechusäure, die folgenden Protokatechusäure und Anteile von Fettsäuren, die letzten gelblichen Sublimate überwiegend Shikimisäure. Die Kristalle der Shikimisäure erscheinen über das ganze Sublimat zerstreut als farblose oder doch nur schwach gelbliche massive Nadeln und Körnchen (im Gegensatz zu den hyalinen und hellen der Protokatechusäure); sie liegen isoliert oder zu drusenartigen Gruppen vereint. Diese Kristalle sind unlöslich in Chloroform; ihr scheinbares Verschwinden in Chloroform beruht auf optischen Ursachen (Brechungsindex), denn nach dem Verdunsten des Chloroforms finden sich die Kristalle in gleicher Gestalt und am gleichen

Orte vor. Sie sind ferner unlöslich in Benzol, Äther und Petroläther, lösen sich in Wasser, Chlorzinkjod, Essigsäure, Chloralhydrat, Ammoniak, Vanillinsalzsäure und Eisenchlorid farblos. Bei gekreuzten Nicols leuchten sie gelb auf; hierbei bemerkt man in den fettglänzenden Tropfen (s. auch S. 165) farblos leuchtende Nädelchen, die Fettsäuren sind. Während Shikimisäure sich in wässriger Chloralhydratlösung sofort löst, bleiben die Fettsäurekristalle zunächst erhalten, um nach einigen Minuten in Tröpfchen überzugehen. Die fettsäurehaltigen Tropfen lösen sich überdies leicht in Chloroform. Die Kristalle der Shikimisäure lösen sich in Salpetersäure farblos; die zuweilen in den Sublimaten vorübergehend auftretende schwache Rötung wird durch noch zu bestimmende Beimengungen verursacht, ebenso jedenfalls die gelbe bis rosa Färbung, die nitrithaltige Schwefelsäure hervorruft.

Zimtsäure.

Zimtsäure (β-Phenylacrylsäure) kommt frei und als Ester vorzugsweise in Sekreten vor: in den Liquidambarbalsamen (Styrax und in denen aus Amerika), im Tolubalsam, in der Sumatrabenzoe, im ätherischen Öle von Alpinia galanga und moluccensis; sie ist gefunden worden in Scrophularia nodosa, Erythroxylon coca, Thea spec., Globularia-Arten u. a. Aus Wasser scheidet sie sich in Nadeln, aus Alkohol in rhombischen Prismen ab, die sich schwer in kaltem Wasser (1 : 3500), leicht in heißem Wasser oder Alkohol lösen. Wie die Benzoesäure so dient auch die Zimtsäure in den Sekreten als Schutzmittel und wahrscheinlich als Antiseptikum. Die Pflanze verklebt ihre Wunden mit antiseptischen Pflastern.

Reine Zimtsäure sublimiert leicht unzersetzt am Objektträger. Die Kriställchen scheiden sich in wenigen Augenblicken ab und polarisieren lebhaft, anfangs grau, später farbig. Selten entstehen kurze Nadeln (10 μ), meist recht charakteristische Blättchen, die oft zu mehreren verwachsen. Die schönsten Kristalle sind am Rande des Sublimates. Bei der Sublimation von 0,01 g Balsam von Liquidambar orientalis (Styrax), von Myroxylon toluifera (Tolubalsam) oder von M. balsamum (Perubalsam) auf der Asbestplatte erhalten wir (Fig. 56) bis 10 starke Sublimate, die vollständig kristallinisch ausfallen. Die Kristalle sind größer entwickelt als die der chemisch reinen Zimtsäure, zeigen aber meist die gleichen Formen (bis 300 μ große Täfelchen und 150 μ große monokline Kristalle) und lösen sich in Wasser, doch langsamer als Benzoesäure. Das Sublimat mit einem Tropfen Kaliumpermanganat bedeckt, entwickelt beim Erwärmen Benzaldehyd-Geruch (Unterschied von Ferulasäure, S. 216). In den Balsamen findet sich zuweilen neben Zimtsäure auch Benzoesäure. Die Unterscheidung beider Säuren ist leicht. Die Benzoesäure-Kristalle erscheinen bei gekreuzten Nicols nur grau, löschen nicht vollständig aus, sind selten

gut ausgebildet. Die Kristalle der Zimtsäure (und ihrer Ester) leuchten prächtig in allen Farben auf, besitzen schiefe Auslöschung und sind vorzüglich entwickelt (Fig. 56). Selbst die Zerrformen der Zimtsäure, die aus kleinen Täfelchen zusammengesetzt sind, zeigen diese Eigenschaften, während die Benzoesäure im Sublimat sehr unscheinbar zur Abscheidung gelangt, so daß man bei gewöhnlicher Beleuchtung stark abblenden muß, um ihre Formen zu erkennen. Beim Liegen der Sublimate an der Luft verflüchtigt sich die Benzoesäure nach mehreren Tagen vollständig.

Bei Zusatz von Silbernitrat werden die Kristalle der Zimtsäure und ihrer Ester unansehnlich, zum Teil braun, verlieren bei gekreuzten Nicols ihre prächtigen Farben und leuchten nur noch schwach grau auf; zum großen Teile gehen sie in Lösung. Die Benzoesäure-Kristalle lösen sich ebenfalls, erscheinen aber bald in besser ausgebildeten, lebhaft polarisierenden Kristallen von benzoesaurem Silber. Bromdämpfe verwandeln Zimtsäure zunächst in braungelbe Tropfen; Benzoesäure bleibt farblos, die Kristalle lösen sich zum Teil. Hat das Zimtsäure-Sublimat etwa $^1/_2$ Stunde auf der Bromflasche gelegen, dann fügt man eine Spur Schwefelkohlenstoff zu, bedeckt mit dem Deckgläschen und läßt einige Zeit liegen. Wir finden nun die Zimtsäure in büschelförmig angeordneten Blättern als Dibromzimtsäure auskristallisiert. Die Kristalle stehen meist senkrecht auf dem Objektträger und erscheinen so als feine Nadeln (Fig. 56e). Emich (Mikroch. S. 170) läßt die Reaktion „in einer zugeschmolzenen Kapillare oder im verkorkten Spitzröhrchen" ausführen. Sie gelingt aber auch am Objektträger und selbst ohne Schwefelkohlenstoff, allein durch Bromdampf. Zimtsäure läßt sich jedenfalls aus allen pflanzlichen Sekreten direkt heraussublimieren. Sie liefert derart typische und leicht zu identifizierende Kristalle, daß ihre Bestimmung vorteilhafter durch Sublimation als auf makrochemischem Wege zu erbringen ist.

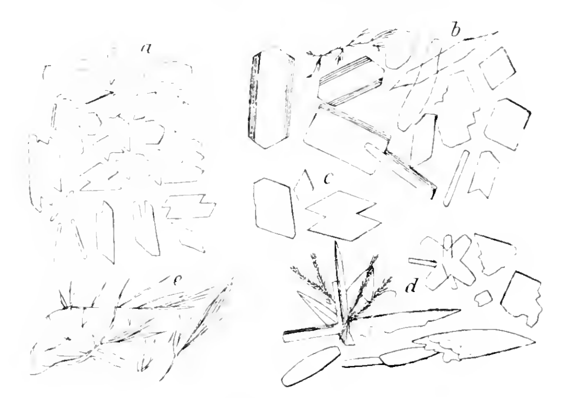


Fig. 56. Zimtsäure, Kristalle im Sublimat: *a*) aus reiner Zimtsäure, *b*) aus Styrax (zum Teil Ester), *c*) aus Tolubalsam, *d*) aus Perubalsam (zum Teil Ester); *e*) Dibromzimtsäure aus *b*, *c* und *d* mit Bromdampf am Objektträger erhalten (Tunmann).

Styracin, der Zimtsäure-Zimtäther, der im Liquidambarbalsam die Zimtsäure begleitet, liefert in reinem Zustande nur tropfenförmige Sublimate. Zimtsäure löst sich unter Deckglas sofort in Alkohol, Styracin nicht. — **Zimtsaures Benzyl** (Kahlbaum) besteht aus Nadeln; im Sublimat findet man fast nur flüssige Kristalle.

Cumarin.

Cumarin (Cumarsäureanhydrid) bildet weiße säulenartige Kristalle (Schmelzpunkt bei 67°), die leicht in fetten Ölen, Ammoniak, Kalilauge, Essigsäure, Alkohol, Äther, heißem Wasser, aber langsam und wenig in Glyzerin und in kaltem Wasser löslich sind, sowie unzersetzt sublimieren. Cumarin wird in einfacher Weise aus Tonkabohnen durch Ausziehen mit Alkohol gewonnen (Ausbeute 1,5 %, doch bis 10 %, Senft). Die Art des Auftretens und die biologische Aufgabe des Körpers sind unbekannt. Der Cumaringeruch macht sich erst beim Welken der Pflanzen bemerkbar, wird bei lebenden Pflanzen mit nicht zu starker Kutikula durch Nekrobiose (Chloroform, Äther, Chlormethyl)[1]) hervorgerufen oder durch Belichtung mit ultravioletten Strahlen[2]).

Cumarin findet sich in: Lindsaea cultrata, Adiantumarten, Phoenix dactylifera, Anthoxanthum odoratum, Hierochloaarten, Milium effusum, Cinna arundinacea, Angraecum fragrans, Nigritella angustifolia, Orchis fusca, Aceras anthropophora. In Dikotylen ist es angegeben für Herniaria glabra, Prunus mahaleb, Dipteryx (Samen), Pteropus, Melilotus, Myroxylon (Samen), Alyxia stellata, Vitis sessiliflora (Knollen), Ceratopetalum, Peristrophe angustifolia, Galium triflorum, Asperula odorata, Ageratum mexicanum, Liatris odoratissima, Achlys triphylla (Berberidaceae), Tabebuia cassinoides, Stenolobium stans (Bignoniaceen), Eupatorium triplinerve[3]). Eine Revision der zahlreichen Angaben über das Vorkommen von Cumarin erscheint notwendig. Für Ruta graveolens hatten Zwenger und Bodenbender Cumarin angegeben, was Nestler nicht bestätigen konnte.

Den mikrochemischen Nachweis durch Mikrosublimation führte Nestler[4]) ein. Bei den Samen von Dipteryx odorata (Tonkabohnen) erhält man mit 0,005 g schweren Fragmenten der Kotyledonen ein Sublimat von undeutlich ausgebildeten Prismen, die zu gekrümmten Gebilden vereint sind. Sie besitzen starken Cumaringeruch, verflüchtigen sich allmählich an der Luft und zeigen die oben angeführten Löslichkeitsverhältnisse. Setzt man zur Lösung des Sublimates in verd. Natronlauge etwas verdünnte Essigsäure hinzu, dann entstehen lange Kristallnadeln und kleine Prismen. Bei Ageratum mexicanum fehlt Cumarin in den Wurzeln. Das Sublimat der Blätter besteht aus

---

[1]) Ed. Heckel, Compt. rend., 1910, CLI, S. 128.

[2]) Pougnet, Compt. rend., 1910, CLI, S. 566.

[3]) Die bis 1887 bekannten Cumarinpflanzen nach Lojander, Über die Verbreitung des Cumarins im Pflanzenreiche, Journ. de Pharm. von Elsaß-Lothr., 1887.

[4]) A. Nestler, Der direkte Nachweis des Cumarins und Theins durch Sublimation, Ber. d. bot. Ges., 1901, XIX, S. 354.

bis 1 cm langen Kristallnadeln, kleinen Prismen und Kombinationen, sowie aus Aggregaten, die feine Querstreifung erkennen lassen. Asperula odorata zeigt im Sublimat Prismen und Nadeln: Hierochloa australis, odorata und Anthoxanthum odoratum zeigen außerdem büschelförmige Aggregate. Prunus mahaleb führt Cumarin in den Blättern und in der Rinde, nicht im Holz. Im Sublimat bilden sich bis 120 μ lange und 4 μ breite Prismen.

Im allgemeinen ist die Kristallform des sublimierten Cumarins wenig beweisend. Aus den sublimierten Wassertropfen bilden sich zunächst kraterförmige Gebilde, dann moosförmig verzweigte Formen, schließlich längere gebogene Kristallfäden, die aus Einzelkristallen bestehen und an die kleinere Prismen ansetzen. Am häufigsten erhält man kleine gebogene Kristalle. Ähnliche Kristallformen erhält man aus vielen Blüten, die kein Cumarin enthalten. Es empfiehlt sich, das Rohsublimat umzusublimieren: man erzielt dadurch bessere Kristalle. Das Sublimat muß sofort durchmustert werden, denn bei längerem Liegen an der Luft werden die Kristalle undeutlich, zerfließen und verflüchtigen schließlich. Cumarinhaltige Drogen geben noch nach längerer Aufbewahrung schöne Sublimate. Blätter von Liatris odoratissima, die 6 Jahre in einem Beutel aufbewahrt waren, gaben mir ein starkes Sublimat (Fig. 57a). Die Dauer der Mikrosublimation richtet sich nach der Menge des vorhandenen Cumarins, weit mehr aber nach der Beschaffenheit der Gewebe. Um die geringen Spuren des in den Blattstielbasen von Liatris enthaltenen Cumarins nachweisen zu können, muß die Sublimation wenigstens dreimal so lange dauern als bei Verarbeitung der Blattspreite. Die Sublimation gestattet eine annähernde Lokalisationsermittelung. Die Trennung der einzelnen Gewebeschichten, die gesondert der Sublimation unterzogen werden, muß an frischem Material vorgenommen werden, da Cumarin leicht an sekundäre Lagerstätten gelangt.

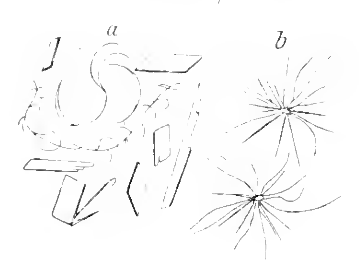


Fig. 57. Liatris odoratissima, a) Cumarinkristalle im Mikrosublimat. b) Jodverbindung des Cumarins (mit Chlorzinkjod) (Tunmann).

In den Zellen weist man es mit Hilfe der Chlorzinkjodreaktion nach. Cumarin geht als Anhydrid mit Jod (und auch mit Brom) Verbindungen ein, die kristallinisch sind. Mit Chlorzinkjod entstehen sehr lange und zarte, hin- und hergebogene, schmutzigbräunlichviolette Kristallfäden, welche sich zu Büscheln vereinigen (Fig. 57b). Mit diesem Verfahren konnte Senft den Beweis erbringen, daß in der Tonkabohne das Cumarin in den Zellen der Keimblätter im fetten

Öle gelöst auftritt. Die Fruchtschale enthält kein Cumarin, wohl aber der reife und der unreife Samen[1]). Durch Schrumpfung der peripheren Gewebe wird das cumarinhaltige fette Öl herausgepreßt und das Cumarin gelangt auf der Oberfläche der Samenschale und zwischen den Keimblättern zur Ausscheidung.

Chlorogensäure.

Die von Gorter[2]) in neuerer Zeit aufgefundene und eingehend studierte Chlorogensäure, scheint Leguminosen und Meliaceen zu fehlen, tritt aber reichlich in Araliaceen, Convolvulaceen, Boragineen, Gesneraceen, Acanthaceen und Compositen auf. Sie findet sich in vielen Samen (Coffea 4%, Strychnos nux vomica, Helianthus annuus, Kopsia flavida u. a.). Von Penicillium und Mucor wird sie in Kaffeesäure übergeführt. Sie ist eine zweibasische Säure, der Hauptbestandteil der Kaffeegerbsäure (neben Coffalsäure) und bildet farblose Nädelchen, die gerbstoffartige Farbenreaktionen geben, aus ihren Lösungen aber nicht wie Gerbstoff durch Eiweiß, Gelatine oder Antipyrin gefällt werden.

Der Nachweis der Chlorogensäure läßt sich mit geringem Aufwand an Material erbringen. Es sei daher die Methode von Gorter mitgeteilt. 10 g frühmorgens gepflückte und frisch zerschnittene Blätter werden 1 Stunde mit 50 ccm Salzsäure am Rückflußkühler gekocht (10 ccm konz. Salzsäure + 40 ccm Wasser). Das Filtrat wird mit 15 ccm Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wird abgehoben: sie ist gelb und fluoresziert blau, wird mit Natriumbikarbonat geschüttelt, zweimal mit Wasser gewaschen und schließlich auf 4 ccm Wasser gegossen, das 1 Tropfen 5% Eisenchlorid enthält. Beim Umschütteln entsteht nach 1—2 Minuten eine Violettfärbung der wässerigen Schicht, die Farbe verblaßt nach einiger Zeit: der Äther wird gelb. Die Reaktion beruht auf Oxydationsvorgängen und ist so scharf, daß sie oft schon mit 1 g gelingt, so nach Charaux[3]) bei Ballota foetida. Dieser Forscher kocht die Pflanzenteile mit 5—10% Schwefelsäure, nimmt das Filtrat mit Äther auf, schüttelt die ätherische Lösung mit 1/4 Volumen Wasser, läßt absetzen und hebt die Ätherlösung ab. Der Äther wird abdestilliert und mit dem Rückstand werden die Reaktionen ausgeführt. Der Rückstand gibt die Eisenchloridreaktion, wird mit konz. Sodalösung blau, dann violett, mit Schwefelsäure orangefarben, bei Wasserzusatz rot.

---

[1]) Em. Senft, Über das Vorkommen und den Nachweis des Cumarins in den Tonkabohnen, Pharm. Praxis, 1904, III, Heft 3, Sep.

[2]) K. Gorter, Sur la distribution de l'acide chlorogénique dans la nature, Ann. de Buitenzorg., 1909, XXIII, S. 69.

[3]) Ch. Charaux, Sur l'acide chlorogénique, Journ. de Pharm. et de Chim., 1910, 7 sér. II, S. 292.

Wo eine Trennung der Gewebe auf mechanischem Wege möglich ist, wird die Reaktion zur Lokalisationsermittelung dienen können.

Ferulasäure.

Ferulasäure (Methoxylkaffeesäure) bildet farblose, bei 169° schmelzende Nadeln und findet sich in verschiedenen Harzen (Asa foetida, Barth und Hlasiwetz, 1866, im Überwallungsharz von Pinus laricio, Bamberger, Umbelliferenopopanax, Tschirch und Knitl, 1899).

Der mikrochemische Nachweis gelingt einwandfrei mittels Mikrosublimation (Tunmann[1]). Sublimate erhält man bereits mit 0,05 g Asantharz oder mit 0,5 g alkoholischer Tinktur. Auch Präparate von Ferula narthex Boissier, die Sekretbehälter enthalten, geben reichliche Sublimate (Fig. 58). Das Harz (Droge) muß zuvor fein zerrieben werden. Bei der Sublimation entwickelt sich ein kräftiger Geruch nach gebratenen Zwiebeln. Das Sublimationsfeld erscheint rein weiß und von mattem wachsartigen Aussehen. Nur bei zu hoch gesteigerter Temperatur und bei zu langer Sublimationsdauer finden sich außerdem braune Massen und ölige Tropfen. Die sublimierten Kristalle zeigen verschiedene Formen, deren Entstehung abhängig ist von der Menge der vorhandenen Substanz, von der bei der Sublimation angewandten Temperatur und von der mehr oder weniger schnellen Kristallisation. Sehr geringe Mengen liefern einen kleinkörnigen Belag. Bei mehr Substanz (einige Zentigramm) bilden sich zunächst kurze Nadeln, dann etwas längere Kristalle, die an einem Ende etwas breiter sind und die sich schließlich zu Rosetten, Garben und strauchartigen Gebilden vereinigen. Außerdem erfolgt Bildung von bis zu 9 μ breiten Stäbchen, an deren Enden sich kleinere Kristalle pinsel- und strauchartig ansetzen (Fig. 58). Die bei mikroskopischer Betrachtung farblosen Kristalle lösen sich in heißem Wasser, in Alkohol, Äther, Schwefelsäure (mit gelber Farbe) und geben mit Eisenchlorid dunkelbraune schmierige Massen. Mit einem Tropfen wässeriger Kaliumpermanganatlösung versetzt, entwickelt das zuvor völlig geruchlose Sublimat kräftigen Vanillingeruch. Von Phloroglucinsalzsäure werden die Kristalle sofort mit tiefroter Farbe gelöst.

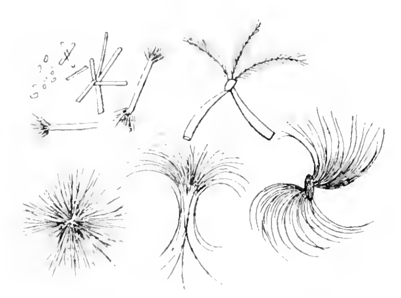


Fig. 58. Ferula narthex, Kristalltypen von Ferulasäure im Sublimat eines Tropfen Sekretes (Tunmann).

[1]) Tunmann, Beitr. z. angew. Pflanzenmikrochemie, Der mikrochem. Nachw. d. Asa foetida, Gehe Berichte, 1911, S. 160.

Vanillin begleitet in Spuren (bis 0,06 %) die Asa foetida-Droge und bildet sich wahrscheinlich erst bei längerem Aufbewahren derselben. Bei der Untersuchung kommen diese Spuren nicht in Betracht; sie können überdies leicht entfernt werden, wenn man das Sublimat einige Zeit auf einer erwärmten (30—40°) Asbestplatte liegen läßt.

Ferulasäure wird in den Ferulaarten ausschließlich im Milchsaft der schizogenen Gänge gebildet. Beim Trocknen der Pflanzen imprägniert sie aber die Wände der sezernierenden Zellen, bisweilen auch des Markes und täuscht derart verholzte Gewebe vor. Diese durch Phloroglucinsalzsäure hier vorgetäuschte Ligninreaktion bleibt bei wiederholt mit Alkohol behandelten Präparaten aus. Wahrscheinlich kommt Ferulasäure häufiger in pflanzlichen Sekreten vor und verursacht die oft erwähnte „Verholzung" der Sezernierungszellen. Legt man die gefärbten Schnitte auf einige Tage in Glyzerin, dann ist die Holzfärbung stark abgeblaßt, während die Tropfen der Ferulasäure in den Gängen und die mit der Säure imprägnierten Membranen ihre leuchtend rote Farbe behalten und selbst nach Wochen nicht verlieren[1]).

Umbelliferon.

Umbelliferon (4-Oxycumarin) bildet farblose, bei 225° schmelzende Prismen und findet sich in verschiedenen Harzen (Sagapen, Galbanum). Es entsteht bei der trockenen Destillation von Galbanum und des alkoholischen Auszuges von Daphne mezereum. Sein Methyläther ist das Herniarin (Herniaria hirsuta).

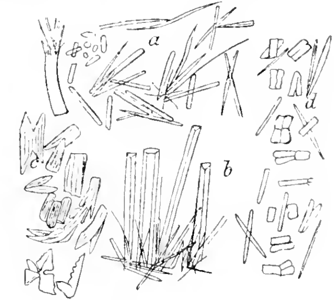


Fig. 59. Umbelliferonnachweis: *a*) Sublimat von Ferula galbaniflua (sekrethaltiger Längsschnitt); *b*) mit Wasser, *c*) mit Chloralhydrat umkristallisiert; *d*) Sublimat des Sagapenharzes (Tunmann).

Umbelliferon läßt sich mikrochemisch leicht durch Sublimation nachweisen (Tunmann). 1—2 mg Sagapenharz oder Galbanumharz (Drogen) oder einige Sekret führende Schnitte von Ferula galbaniflua (Längsschnitte des Stengels) auf der Asbestplatte bei 5 cm hoher Spiritusflamme erhitzt, geben nach 3 Minuten 6—10 starke, rein kristallinische Sublimate von Umbelliferon. Die Rezipienten (Objektträger) dürfen nicht zu schnell gewechselt werden. Die ersten Sublimate bestehen nur aus Körnchen, die folgenden aus kurzen Stäbchen, die letzten aus bis 20—30 μ langen Nadeln und Prismen. Die Kristalle liegen einzeln, charakteristische Figuren

---

[1]) O. Tunmann, Über Ferula Narthex Boissier, insbesondere über die Sekretgänge dieser Pflanze, Ber. deutsch. bot. Ges., 1912, XXX, S. 245.

fehlen. Die Kristalle scheiden sich sofort aus, lösen sich leicht in Alkohol, Chloralhydrat, Anilin und Äther, schwer in Wasser. Sie lösen sich leicht in heißem Wasser, um sich beim Erkalten am Rande des Tropfens sofort in bis 80 μ langen Prismen abzuscheiden (Fig. 59). Außerdem erscheinen in der wässerigen Lösung schaumige, ölartige Tropfen. Das Sublimat ist demnach trotz seiner äußerlich reinen Beschaffenheit nicht einheitlicher Natur. Typisch ist die blaue Fluoreszenz der Lösungen (auch der Chloralhydrat-, nicht der Anilinlösung), die mikroskopisch am Rande des Tropfens gut zu sehen ist. Makroskopisch ist die blaue Farbe beim Halten des Objektträgers über eine schwarze Unterlage sichtbar.

Der Umbelliferonnachweis gelingt ferner bei Daphne mezereum mit 0,05 g Pulver, wenn man dieses mit Alkohol auf dem Objektträger auszieht, das Extrakt abschleppt und nach vorsichtigem Eintrocknen sublimiert. Wahrscheinlich wird auch das Herniarin durch Sublimation nachweisbar sein.

Indol und Skatol.

Indol (α-β-Benzopyrrol), in reinem Zustande farblose Blättchen bildend, löst sich leicht in heißem Wasser, Alkohol und Äther und ist mit Wasserdämpfen flüchtig. Es findet sich in geringer Menge im ätherischen Öle verschiedener Blüten (Jasminum, Cytisus, Coffea- und Citrus-Arten, Murraya exotica, Caladium), auch im Champignon[1]. Skatol (Methylindol) bildet ebenfalls weiße, mit Wasserdämpfen flüchtige Blättchen, die sich im Wasser schwer lösen; es ist in Nectandra-Arten und Celtis reticulosa (Stammholz 0,01 %) aufgefunden worden. Indol und Skatol sollen bei der enzymatischen Spaltung der Proteine entstehen.

Zum Nachweis von Indol läßt sich Oxalsäure benutzen. Wird Oxalsäure mit Indol geschmolzen, dann entsteht ein rotes Produkt, selbst bei Zimmertemperatur färben Indoldämpfe eine konzentrierte Oxalsäurelösung rosenrot. Diese Indolreaktion wird mit lebenden Jasmin- und Goldregenblüten in folgender Weise angestellt: Man bringt in einen Glastrichter einen mit konzentrierter wässeriger Oxalsäurelösung getränkten Bausch von Watte oder Glaswolle, bedeckt diesen mit einer kleinen Glasplatte und legt eine eben aufgebrochene Jasminblüte darauf. Der Bausch färbt sich durch die Indoldämpfe innerhalb 25 Minuten rosa, nach längerer Zeit violett. Bringt man ferner den

[1]) Im Champignon ist Indol auf den Gehalt des Bodens an Pferdedünger und Pferdeharn zurückzuführen, auf Stoffe, die reich an Indikan sind. Ein wässeriger Auszug von Champignon vorsichtig mit Schwefelsäure überschichtet, gibt an der Berührungszone einen violetten Ring (Indikan, M. Löwy, Der Champignon, eine indolbildende Pflanze, Chem.-Ztg., 1910, XXXIV, S. 340). S. auch Kautschuk, Verlauf der Milchröhren.

Oxalsäurebausch, sei es in einer Kristallisierschale, sei es in einem Glastrichter über eine Blüte, dann wird letztere gefärbt und die entstandenen Farben lassen sich mikroskopisch an Präparaten erkennen[1].

Weehuizen[2]) weist Indol im alkoholischen Auszug der zerquetschten Blumenblätter nach mit einer 1 %igen Lösung von Vanillin oder Paradimethylamidobenzaldehyd in einer Mischung gleicher Teile Alkohol und starker Salzsäure. Bei gefärbten Blüten oder bei solchen, die sich beim Zerquetschen bräunen (Coffea), ist es vorteilhafter, die Blüten in ein Glasgefäß zu geben und an den Deckel einen Streifen Filtrierpapier zu befestigen, das mit den erwähnten Reagentien (Oxalsäure, Vanillin oder Paradimethylamidobenzaldehyd) durchtränkt ist. Derart fand Sack[3]) Indol in den Blumendüften von Citrus- und Coffeaarten, Baccarini[4]) in zahlreichen Monocotylen-Blüten und in den vegetativen Teilen von Myrtus und Tilia. Die Prüfung mit Oxalsäure ist am sichersten, doch müssen alle Reaktionen ausgeführt werden und nur bei gleichen Ergebnissen darf auf die Anwesenheit von Indol geschlossen werden.

Die Prüfung auf Skatol fällt zum Teil in das Gebiet der Makrochemie. Man versetzt das aus dem zerstoßenen Pflanzenmaterial mit Wasserdampf erhaltene Destillat mit einer Lösung von 5 % Vanillin in 96 % Alkohol und einigen Tropfen starker Salzsäure. Es tritt rotviolette Färbung ein, die bei Zusatz einiger Tropfen einer 0,5 %igen Natriumnitritlösung in Blauviolett übergeht. Oxalsäure-Watte wird durch Skatol nicht gefärbt. Zur Lokalisation im Gewebe kann eine ätherische Pikrinsäurelösung benutzt werden, sowie eine 2 %ige Lösung von Glukose in starker Salzsäure. Die eintretenden Farbenreaktionen zeigen Skatol in den eiweißhaltigen Zellen des Holzes an (Markstrahlen, Parenchym). — Bei größeren Mengen dürfte möglicherweise die Sublimation angefeuchteter Schnitte zum Ziele führen.

Juglon.

Juglon (Nucin, Regianin, Oxy-α-Naphthochinon), von Vogel und Reischauer 1856 entdeckt, bildet gelb- bis braunrote lange Nadeln (Mylius, Ber. chem. Ges., 1884 u. 85) und kommt neben α- und β-Hydrojuglon in den noch grünen Schalen

[1]) E. Verschaffelt, Réact. q. permett. déceler l'indol d. l. parf. d. fleurs, Rec. d. trav. bot. Néerl., 1904, I, S. 120.

[2]) F. Weehuizen, Über indoloide Düfte, Rec. d. trav. bot. Néerl., 1911, VIII, S. 97.

[3]) J. Sack, Einige phytochemische Mitteilungen, Pharm. Weekbl., 1911, XLVIII, Nr. 13.

[4]) P. Baccarini, Sopra la presenza di Indolo nei fiori di alcune piante, Bull. Soc. bot. ital., 1910, S. 96 u. 1911, S. 105.

der Früchte und in allen jugendlichen Organen von Juglans regia vor. Es ist nicht ausgeschlossen, daß glykosidische Körper vorliegen. Nach Tunmann[1]) häufen sich die Juglone im Wundgewebe an (Wundschutzpigmente). Bei weiterer Entwicklung verschwinden sie, zuerst im Innern der Gewebe, zuletzt in den subepidermalen Partien.

Zum mikrochemischen Nachweis benutzte Herrmann[2]) Ammoniakdämpfe; die entstehende purpurrote Färbung zeigt Juglon an. Die Färbung wird nach einiger Zeit braun. Die besten Erfolge erzielt man nach Tunmann mit einer wässerigen Lösung von Kupferazetat (1 : 10). In kurzer Zeit entstehen in den Zellen bis 20 μ lange Kristallnadeln, die sich zu fast schwarzen Drusen vereinigen. Der Schnitt wird in wässeriges Chloralhydrat gelegt (nicht durchsaugen oder erwärmen). Die Drusen erscheinen karmoisinrot, der Schnitt ist gut aufgehellt. Mit alkoholischem Kupferazetat bildet sich Juglonkupfer außerhalb der Zellen (am Deckglasrande bis 200 μ große schwarzbraune Kristallgruppen). Dämpfe von Salpetersäure erzeugen kugelige Gebilde von schwarzer Farbe und kristallinischer Natur (Juglonsäure?). Anilin bewirkt am Deckglasrande bis 300 μ große braunrote Kristallgruppen, die hellrot polarisieren, Bromwasser braungelbe Kristalle. Bei frischem Material entstehen außerhalb des Gewebes Juglonkristalle (kurze tiefgelbe Nadeln) beim Einlegen in Wasser (am besten kalkhaltiges Leitungswasser), bei Glyzerin- oder Alkoholzusatz, selbst beim Eintrocknen eines etwas zerquetschten Schnittes[3]). Die farblosen Zellen führen α-Hydrojuglon, die gelben Juglon. Die farblosen Zellen werden beim Liegen (trocken unter Deckglas) bald gelb, α-Hydrojuglon geht in Juglon über. Bei der Sublimation liefert 1 mg 2—3 starke Sublimate von Juglonkristallen. Bei ganz frischem Material



Fig. 60. Juglonnachweis in Juglans regia. a) Parenchym des mittleren Exocarps, bei Wasserzusatz gelbe Juglonkristalle; b) ein eingetrockneter Tropfen des Sublimates mit Juglonkristallen; c) Kristalle von Juglonkupfer; d) aus Anilin abgeschiedene rotbraune Kristalle (Tunmann).

[1]) O. Tunmann, Über den mikrochemischen Nachweis und die Lokalisation der Juglone in Juglans regia, Pharm. Zentralhl., 1912, LIII, S. 1005.

[2]) O. Herrmann, Nachweis einiger organischer Verbindungen in den vegetabilischen Geweben, Dissertation Leipzig 1876, S. 27.

[3]) Die Plasmolyse hat auch R. Chemineau benutzt (Rech. microchim. sur quelques glucosides, Tours 1904, S. 61).

bilden sich schon im Anfange der Sublimation zeisiggelbe α-Hydrojuglonkristalle, bei, einige Zeit gelagertem Material und höherer Temperatur rötliche Juglonkristalle. Erstere gehen beim Liegen in Juglon über. Die Kristalle lösen sich in Alkohol, Chloroform, Anilin, langsam in Äther und Petroläther, tiefrot in Schwefelsäure, violettblau in Ammoniak; konzentrierte Kalilauge färbt fast schwarz, löst wenig, verdünnte Kalilauge löst sofort rötlich (vergl. Fig. 60).

Wahrscheinlich lassen sich sämtliche in den Pflanzen auftretende Naphthalinderivate direkt aus Schnitten heraussublimieren und zwar in diagnostisch einwandfreier Weise. Dies gilt für das Lapachol der brasilianischen Bignoniacee Tecoma chrysotricha, für den von Wefers-Bettink aufgefundenen Köıper der Apocynacee Ophioxylum serpentinum (Wurzel) u. a.

Ätherische Öle.

Als ätherische Öle faßt man in der Chemie stark riechende Körper zusammen, die fast ausschließlich aus dem Pflanzenreiche stammen und sich durch gemeinsame physikalische Eigenschaften auszeichnen, während sie in ihrer chemischen Zusammensetzung Gemenge verschiedener Substanzen bilden. Ihre Hauptbestandteile sind Kohlenwasserstoffe (Terpen, Sesquiterpen), sowie sauerstoffhaltige Bestandteile (Alkohole, Aldehyde, Ketone, zusammengesetzte Ester und Phenole). Während die meisten ätherischen Öle in den Pflanzen fertig gebildet vorkommen, finden sich einige in Glykosidform und entstehen erst bei der Spaltung dieser Glykoside, wie die Öle, die schwefelhaltig sind oder Ester der Salizylsäure führen. Die isolierten ätherischen Öle erleiden durch Luft und Licht allmählich eine Veränderung in Farbe, Reaktion u. a., welche man als Verharzung bezeichnet. Dieser Vorgang, bei dem schließlich mehr oder weniger feste Körper (Balsame, Harze) zurückbleiben, erfolgt in der lebenden Pflanze, teils frühzeitig im Lebensprozeß (in den schizogenen Gängen der Coniferen u. a.), teils am Ende der Vegetation; so geht das ätherische Öl in den Menthadrüsen im Spätherbst in Balsam über und man trifft alsdann im lebenden Material subkutikular einen grüngelben, mehr oder weniger festen Ballen an.

Es ist erwiesen, daß jene Körper, die wir als ölig-harzige Sekrete zusammenfassen und im mikroskopischen Bilde sehen, nur in den Sekretbehältern selbst lokalisiert sind. Nachdem Hanstein[1]) die Vermutung ausgesprochen hatte, daß die ätherischen Öle und Harze erst im Sekretraum gebildet werden aus „in chemisch anderer Gestalt hierher gewanderten" Substanzen, sagt de Bary[2]), „daß das Sekret, zunächst das harzige in der Wand (des Sekretraumes) selbst abgeschieden wird und auch dort entsteht" und A. Meyer[3]) vertritt bei den schizogenen

---

[1]) J. Hanstein, Über die Organe der Harz- und Schleimabsonderung in den Laubknospen, Bot. Ztg., 1868, XXVI, S. 777.

[2]) A. de Bary, Vergl. Anatomie d. Vegetationsorgane, 1877, S. 98.

[3]) A. Meyer, Über die Entstehung der Scheidewände in dem sekret-

Gängen die gleiche Ansicht. Nach Tschirch[1]) bildet sich das Sekret ohne Beteiligung des Plasma in einer zur Membran der sezernierenden Zellen gehörenden Schleimschichte, in der resinogenen Schicht (s. d.). Über die Bildung der ätherischen Öle in den Ölzellen sind die Ansichten noch geteilt (Haberlandt u. a.)[2]). Die Substanzen, welche sich am Aufbau der Sekrete beteiligen, müssen naturgemäß aus dem benachbarten Gewebe stammen. In der Voraussetzung, daß sich hierbei die Inhalte der sezernierenden Zellen (Epithelzellen) beteiligen, wird man Fette[3]) und glykosidische Gerbstoffe[4]) (Tunmann) als resinogene Substanzen bezeichnen müssen.

Zu den Sekretbehältern, die ätherische Öle und Harze führen, zählen: die Epidermaldrüsen (Drüsenhaare, -flächen, drüsige Blattzähne, Zwischenwanddrüsen), interzellulare Drüsenhaare (Aspidium, Pogostemon, Dysophylla), Ölzellen (Zingiberaceen, Piperaceen, Lauraceen, Myristicaceen, Araceen, Magnoliaceen, Convolvulaceen, Liliaceen u. a.), schizogene Behälter und Gänge (Umbelliferen, Myrtaceen, Compositen, Coniferen, Guttiferen, Burseraceen, Dipterocarpaceen u. a.), schizolysigene Behälter (Aurantiaceen, Diosmeen, Rutaceen); fallen ganze Gewebekomplexe der „Verharzung" anheim, so spricht man von Destruktionslücken (Agaricus, Xanthorrhoea). Die ätherischen Öle dienen der Pflanze als Schutzmittel gegen zu starke Transpiration (Hansteins Colleteren; Volkens' lackierte Blätter) und gegen Angriffe von Tieren (Stahl). Sie sind Lockmittel für Insekten (zur Fremdenbestäubung). Weniger begründet ist die Ansicht Tyndalls (Herabsetzung der Diathermansie); nach Giglioli sollen sie die Vollsaftigkeit der Gewebe erhöhen und die Zellmembran permeabel für Substanzen machen, die sonst nicht diosmieren könnten (?).

Der mikrochemische Nachweis der ätherischen Öle ist derzeit mit einiger Sicherheit nur in jenen Fällen zu erbringen, in denen sich größere Mengen auf relativ kleinem Raum angehäuft finden wie im subkutikularen Raum der Epidermaldrüsen oder im Lumen der Ölzellen. Doch selbst in diesen Fällen muß man mit der Anschauung brechen, in dem „ätherischen Öle" einen Körper chemisch einheitlicher Zusammensetzung zu sehen oder jenes Produkt, das der Chemiker bei der Destillation aus der betreffenden Pflanze gewinnt. Die ätherischen Öle im Gewebe, resp. die Inhalte des Sekretraumes, bestehen nicht nur aus ätherischem Öle und Schleim, wie man bis in die neueste Zeit meist

---

führenden, plasmafreien Interzellularraume der Vittae der Umbelliferen, Bot. Ztg., 1889, XLVII, S. 341.

[1]) A. Tschirch, Harze und Harzbehälter, Bot. Teil.

[2]) G. Haberlandt, Physiol. Pflanzenanatomie, 1904, S. 450 u. 478; W. Berthold, Protoplasmamechanik, 1886, S. 25 und R. Müller, Zur Anatomie und Entwickelungsgeschichte der Ölbehälter, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 292.

[3]) O. Tunmann, Über die Sekretdrüsen, Dissertat. Bern, 1900.

[4]) O. Tunmann, Beitr. zur Kenntnis der Hautdrüsen, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1908, XVIII, S. 492.

annimmt. Es ist schon lange bekannt, daß im ätherischen Öle Alkaloide (Piperin), Laktone (Santonin), Farbstoffe (Chinone) und andere Körper lokalisiert sind. Diese Körper hat man bei der Diagnose berücksichtigt; wir finden jedoch häufig Fette, subkutikular bei vielen Compositendrüsen, Labiaten (Fig. 61) u. a. (Tunmann), in den schizogenen Gängen bei Coniferen (Gingko, Senft), Gerbstoffe (Orthosiphon. Salvia, Eriodictyon, Tunmann, Gardenia, Spermolepis, Heckel[1]), glykosidische Körper (Ölzellen, Exogonium purga), ferner bei Labiaten, Compositen, Umbelliferen und Coniferen und wohl auch anderwärts Magnesium, zuweilen Kalium. Nun sollte bei den Studien über die Entstehung und die Lokalisation der ätherischen Öle der Nachweis erbracht werden, ob die stark lichtbrechenden Gebilde in den Serzernierungszellen mit dem Öle des Sekretraumes chemisch übereinstimmen. Diese Fragestellung konnte überwiegend nur zu negativen Resultaten führen, eben weil im Sekretraum sehr oft Gemische vorliegen, in denen das ätherische Öl nicht einmal den Hauptbestandteil bildet. Zuweilen überwiegt Fett derart, daß es richtiger wäre, von Fettdrüsen zu sprechen (Salvia glutinosa, Fig. 61). Auch zeigten neuere Betrachtungen, daß nicht alle stark lichtbrechenden Tröpfchen der Drüsen und Drüsenstielzellen vorgebildet sind, sondern erst bei Einwirkung von Wasser entstehen. Beobachtet man eine Drüse von Syringa trocken unter Deckglas, so findet man im Stiel und in den Drüsenzellen nur selten „Tröpfchen"; diese treten zahlreich hervor, wenn die Drüse einige Minuten in Wasser liegt. Es scheint, daß das Vorhandensein eines Ölplasmas nicht auf Samen beschränkt ist. Schleimmassen, die aus der resinogenen Schicht (s. d). stammen, sind in allen Sekretbehältern zugegen. Bei der Charakteristik der ätherischen Öle muß das Vegetationsstadium der Pflanze und die Jahreszeit berücksichtigt werden (s. S. 221), sowie die Lokalisation der Sekretbehälter. Das Sekret der schizogenen Behälter ist stets von anderer Beschaffenheit wie das der Drüsen, selbst dann, wenn die Sekretbehälter wie bei den Grindelien nur durch wenige



Fig. 61. Salvia glutinosa, Drüse vom Kelchrande. Grundmasse des Sekretes Fett (nicht Harz, ätherisches Öl nur in Spuren). Myelinformen mit konz. Kalilauge; man beachte, daß die Reaktion auch in dem spontan ausgeflossenen Sekrete auftritt (Tunmann).

[1]) Heckel u. Schlagdenhauffen, Sur les rapports génétiques des matières résineuses et tanniques d'origine végétale, Compt. rend., 1892, CXIV, S. 1291.

Zelllagen voneinander getrennt sind. Bei den Epidermaldrüsen erfolgt mit einer Stellungsänderung (Blatt und Blüte) zuweilen ein Funktionswechsel und gleichzeitig eine völlige Veränderung im Chemismus des Sekretes. Bei Exogonium purga führen die Drüsen an den Kelchblättern subkutikular kein ätherisches Öl (wie die der jugendlichen Laubblätter), sondern nur Spuren von Fett und in den Sezernierungszellen Anthocyane. Diese Drüsen stehen dicht gedrängt, erzeugen rötliche Punkte auf den Kelchblättern (Schauapparate). Die Drüsen der Antheren von Betonica, Sideritis, Salvia, Marrubium u. a. führen, wie Delpino und E. Loew (Ber. d. bot. Ges., 1886) zeigten, kein ätherisches Öl, sondern Fettgemische.

Schon aus diesen kurzen Bemerkungen geht hervor, daß der Nachweis von ätherischem Öle selbst in den Sekreträumen mit manchen Schwierigkeiten verknüpft ist. Sollen aber kleine Tröpfchen diagnostiziert werden, die diffus im Gewebe zerstreut sind, dann gestaltet sich die Diagnose noch schwieriger und wird häufig unmöglich. Leider ist gerade in diesen Fällen die Diagnose oft recht flüchtig, so hält Häfliger[1]) stark lichtbrechende Tröpfchen im Parenchym von Vanilla deshalb für ätherisches Öl, weil sie beim Kochen (!) mit Wasser verschwinden „und mit 1 $^0/_0$ Osmiumsäure sich leicht braun färben". In ähnlicher Weise urteilte die Mehrzahl der französischen Autoren. Nach Tunmann (Ber. pharm. Ges., 1908, S. 498) sind bei den Epidermaldrüsen sogar „Staubanhäufungen", also anorganische Fremdkörper als Harz angesprochen worden. Einem ähnlichen Irrtum ist Schwalbe bei Rhus toxicodendron verfallen, wie Gilg[2]) in neuester Zeit nachwies.

Zum Nachweis der ätherischen Öle ist tunlichst lebendes Material zu verwenden. Mehrtägiges Einstellen von Menthen und Salvia in Wasser setzt bereits die Löslichkeit der ätherischen Öle herab. Bei allen Methoden muß vor und nach der Reaktion eine genaue Aufnahme mit dem Zeichenapparat gemacht werden. Keine Reaktion, für sich allein ausgeführt, ist beweisend, auch nicht die Flüchtigkeit und der Geruch, da wir über die Art des Vorkommens anderer Körper mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften nicht unterrichtet sind (Benzoesäure, Cumarin u. a.). Erst Spezialreaktionen werden einige Aufklärung bringen. Eine Isolierung des Sekretes ist stets vorteilhaft. Diese kann auf mechanischem Wege geschehen (Herausheben des Sekretes mit der Nadel, Zerdrücken von Epidermaldrüsen). Bei den Hautdrüsen kann

[1]) A. Häfliger, Beiträge zur Anatomie der Vanillaarten, Dissertat. Basel, 1901, S. 13.

[2]) E. Rost u. E. Gilg, Der Giftsumach, Rhus toxicodendron L, u. seine Giftwirkungen, Ber. d. pharm. Ges., 1912, XXII, S. 296.

man auch mit Nestler die Blätter flüchtig mit Äther abspülen und den Rückstand des Ätherauszuges in Untersuchung nehmen. Auch kann man von der Anfertigung von Schnitten absehen und nur vom Blattrande oder von dem zusammengebogenen Blatte einen feinen Streifen mit der Schere abschneiden (Tunmann, 1908). Die im Sekretraum erzielten Befunde sind durch die Reaktionen des isolierten Sekretes zu ergänzen. Gute Dienste leistet in allen Fällen, in denen es sich nicht allein um das ätherische Öl, sondern um die anderen Bestandteile des Sekretes handelt, das freiwillig ausgetretene Sekret, welches am Drüsenstiel und an der Epidermis haftet. Hierbei ist zu bemerken, daß die Sekretion der Drüsen auch nach Sprengung der Kutikula fortdauern kann. Eine Neubildung der Kutikula findet nicht statt (s. Kutikula).

Bei mikroskopischer Betrachtung erscheinen die ätherischen Öle, falls sie nicht in Emulsionen und Gemischen auftreten, als stark lichtbrechende Tröpfchen oder Tropfen, die teils farblos, teils gelblich bis grünlich, seltener bläulich und besonders bei teilweiser Verharzung bräunlich bis rötlich sind. Die mikrochemische Diagnose benutzt die Löslichkeitsverhältnisse, Färbungen und Salzsäuredämpfe. Ausschlaggebend ist die Flüchtigkeit der ätherischen Öle.

Löslichkeitsverhältnisse: Die ätherischen Öle sind unter Deckglas leichter löslich als Harze und Fette. Sie lösen sich leicht in Alkohol, Äther, Ätherweingeist, Chloroform, Schwefelkohlenstoff und Benzol. Die meisten lösen sich leicht in Eisessig und in wässeriger Chloralhydratlösung, eine Eigenschaft, die die überwiegende Anzahl der Fette nicht teilt, namentlich nicht bei Zusatz geringer Mengen Reagens, wie dieses beim Arbeiten unter Deckglas der Fall ist. Die Sekrete von Salix, Corylus, Alnus, Cannabis, Syringa, Aesculus u. a. lösen sich sofort in verdünnten Chloralhydratlösungen. Die ätherischen Öle lösen sich unter Deckglas ziemlich rasch in verdünnter und konzentrierter Kalilauge (Ausnahme: Pelargonium roseum). Naturgemäß ändern sich die Verhältnisse, sobald die ätherischen Öle in Gemischen vorliegen. Stark verdünnte wässerige Lösungen von Chloralhydrat und Kaliumhydroxyd liefern brauchbare Resultate bei der Differentialdiagnose von ätherischem Öl, Harz und Fett.

Durch Alkalien und Säuren, mehr noch durch Jodreagentien, vor allem durch Chlorzinkjod nehmen viele Öle intensive Färbungen (rötlich, seltener gelblich) an. Die Ursachen dieser Färbungen sind meist unbekannt. In einigen Fällen kommt die Jodfärbung Lactonen zu (Alantolacton, Santonin).

Zu Färbungen lassen sich die bei den Fetten, Harzen und Korkmembranen aufgeführten Farbstoffe und Reagentien benutzen. Vorteil-

haft werden die Lösungsmittel mit Farbstoffen kombiniert (vergl. S. 157). Die französischen Autoren benutzen nach Guignard eine essigsaure Lösung von Alkannin (s. Harze). Über die Färbung mit Violet de Paris nach Perrot s. weiter unten. Die Färbung mit Osmiumsäure ist auch hier wenig beweisend. Gerbstoffe werden durch Eau de Javelle entfernt, dann wird gefärbt und schließlich werden die gefärbten Schnitte mit Essigsäure, Chloralhydrat oder Kalilauge behandelt.

Salzsäuredämpfe werden von Mesnard[1]) zur Differentialdiagnose von ätherischem Öl und Fett benutzt (S. 167). Beide zeigen Tropfenbildung, die ätherischen Öle sofort, Fette erst nach 24 Stunden und längerer Zeit. Die goldgelben Tröpfchen des ätherischen Öles verschwinden wieder, Fetttropfen bleiben erhalten. Die Präparate gelangen auf dem Deckgläschen in einen Hängetropfen von stark zuckerhaltigem Glyzerin. Dem Objektträger sind zwei Glasringe aufgekittet, zwischen denen sich die Salzsäure befindet. Der äußere Ring ist höher und auf ihm ruht das Deckglas mit dem Hängetropfen. Das ätherische Öl, das anfangs in goldgelben Tropfen hervortritt, ist nach 25—30 Stunden völlig verschwunden, dann ist der Zellinhalt auf einen einzigen Tropfen zusammengezogen. Werden jetzt die Präparate auf zwei Sekunden Joddämpfen ausgesetzt, dann färbt sich das Fett gelb. Anwesende Gerbstoffe (Viola) werden durch Eintauchen der Schnitte auf einige Minuten in eine Lösung von wolframsaurem Natrium zuvor gefällt. Das ätherische Öl wird in solchen Fällen mehr rötlich. Nach Mesnard sollen nun die ätherischen Öle der Blüten im Zellinhalt auftreten und zwar meist in der oberen Epidermis (Jasmin, Veilchen, Rosen), weniger in der unteren Epidermis (Tuberosen) oder in beiden Epidermen (Orangenblüten).

Bei einigen Menthen lieferte mir das Verfahren gute Erfolge. Den zur Reaktion erforderlichen Objektträger hatte Seibert-Wetzlar in dauerhafter Form hergestellt (Preis 3 M. im Etui).

Die Verdunstungsmethode ist beim Nachweis der ätherischen Öle ausschlaggebend, denn ätherische Öle sind leicht flüchtige Körper. Die Resultate sind nur dann leicht zu erkennen, wenn die Öle nicht in Gemischen vorliegen. Verbleiben Rückstände, so muß eine Kontrolle mit Lösungsmitteln vor und nach dem Verfahren erfolgen. Bisher wurden die ätherischen Öle durch Aufkochen mit Wasser oder durch trockene Wärme vertrieben. Bei der Kochmethode werden die Präparate einige Minuten mit Wasser aufgekocht und vor und nach dem Kochen unter dem Mikroskop durchmustert. Die ätherischen Öle

[1]) E. Mesnard, Rech. sur le mode de production de parfum d. l. fleurs, Compt. rend., 1892, CXV, S. 892.

müssen nun aus den Schnitten entfernt sein, während Fetttropfen in den Präparaten zurückbleiben. Das Kochwasser läßt den Geruch des betreffenden ätherischen Öles erkennen. Doch ist zu beachten, daß, besonders aus dünneren Schnitten, kleinere Fetttropfen auf mechanischem Wege ebenfalls entfernt werden können. Außerdem wird bei vielen Epidermaldrüsen die Kutikula beim Kochen gesprengt, so daß aus dem Sekretraum nicht nur das ätherische Öl, sondern das gesamte Sekret herausfließt. Um diesen Übelstand zu vermeiden, beläßt A. Meyer[1]) die nicht mit einem Deckglase bedeckten Präparate bei 130° zehn Minuten lang im Trockenschrank. Doch wurde von Tschirch[2]) eingewendet, daß bei dieser Behandlung und selbst bei höherer Temperatur viele ätherische Öle einen harzigen Rückstand hinterlassen, was bei der Anwendung trockener Wärme wohl möglich erscheint. Immerhin ist die Methode bei zarten Objekten und bei einzelligen Lebewesen brauchbar, besonders wenn nur geringe Mengen ätherischer Öle vorliegen. So hatte Hartig[3]) die kleinen, stark lichtbrechenden Inhaltskörper in den Sporen von Merulius lacrymans als Fetttropfen angesprochen, die bei der Keimung verbraucht werden sollten. Hingegen konnte sie Wehmer[4]), der sie in allen jüngeren Sporen antraf, innerhalb einer Stunde bei mäßiger Temperatur, nach längerem Liegen an der Luft auch bei Zimmertemperatur zur Verdunstung bringen und hält sie für ätherisches Öl, das wahrscheinlich den champignonartigen Geruch der trockenen Merulius-Fruchtkörper bedingt.

Die Nachteile, die das Kochen mit Wasser und trockene Wärme mit sich bringen, lassen sich durch Anwendung von Dämpfen vermeiden. Man stellt zwei kleine runde Rahmen (5 cm Durchmesser) aus Fischbein oder aus dünnem Rohr her, die auf die Öffnung eines kleinen Kochtöpfchens passen. Die Rahmen werden mit feiner Gaze (Mull) überzogen. Die Schnitte werden auf dem einen Rahmen ausgebreitet und der andere Rahmen wird aufgelegt; sie liegen auf diese Weise fest zwischen zwei Mullagen. Man kann auch zwei Drahtnetze verwenden. Im Kochtöpfchen (kleine Blechschachtel) wird Wasser bis zum Sieden erhitzt und beim Aufsteigen der Dämpfe der Rahmen mit den Schnitten aufgelegt. Die Dämpfe durchströmen die Schnitte, welche keine mechanischen Verletzungen erleiden, und entführen die

---

[1]) A. Meyer, Das Chlorophyllkorn, S. 28.

[2]) A. Tschirch, Die Einwände der Frau Schwabach gegen meine Theorie der Harzbildung, Ber. d. bot. Ges., 1901, XIX, S. 25.

[3]) Hartig-v. Tubeuf, Der echte Hausschwamm, 1903, II. Aufl., S. 24.

[4]) C. Wehmer, Die Natur der lichtbrechenden Tröpfchen in den Sporen des Hausschwamms, Ber. d. bot. Ges., 1911, XXIX, S. 483.

ätherischen Öle in wenigen Minuten (3—5). Bei mit ätherischem Öle imprägnierten Holundermarkscheiben sind harzige Rückstände nicht zurückgeblieben, auch nicht bei Epidermaldrüsen, vorausgesetzt, daß bei diesen das Sekret nur aus ätherischem Öle bestand. Hingegen bleibt die Kutikula erhalten, was beim Kochen der Schnitte mit Wasser nie (Labiaten) oder doch nur selten (Compositen) der Fall ist. Man kann ferner auf den Rahmen ein passendes, möglichst tiefes Uhrglas legen, in dem sich die Wasserdämpfe nebst dem ätherischem Öle ansammeln. Doch ist es angebracht, das Uhrglas alle 1—2 Minuten durch ein anderes zu ersetzen, sonst fließen die kondensierten Destillationsprodukte ins Kochwasser herab. Für die Schnitte selbst ist hierbei kein Nachteil zu befürchten, falls sie in der Mitte des Mullrahmens liegen. Die Uhrgläser mit den Destillaten werden zur Abkühlung auf eine Glasplatte gelegt und die Destillate untersucht.

Es war bereits erwähnt (S. 223), daß ätherische Öle in Gemischen mit Fetten auftreten. Bei Cypripedien fand Nestler[1]) ebenfalls Fettsäuren (Ölsäuren?) im Sekretraum (s. auch Capsaicin). Die in Sporangien von Mortierella van Tieghemi vorkommenden glänzenden, stark lichtbrechenden Kugeln, die aus zahlreichen kleinen Kügelchen zusammengesetzt sind, werden mit Osmiumsäure braun, lösen sich aber nur zum Teil in Chloroform und in Alkohol. Nach Bachmann[2]) liegt ein Gemisch von Fett und ätherischem Öl vor; letzteres ist vielleicht der Träger des eigentümlichen Geruches des Pilzes.

Bei den Primeln kommt die hautreizende Wirkung (Nestler) einem kristallinischen Körper des Sekrets zu. Kobert[3]) fand, daß im Sekret von Primula obconica und Pr. sinensis Kristalle auftreten (ein Befund, den de Bary[4]) bereits erwähnt), die sich leicht in Alkohol, Chloroform, Terpentinöl und Äther lösen und in Wasser unlöslich sind. Am eingehendsten hat sich Nestler[5]) mit den Kristallen beschäftigt. Bei Zusatz von Salzsäure tritt bei Pr. obconica Vermehrung der Kristalle ein, die dann zu Garben und Büschel zusammentreten. Sie lösen sich ferner in Schwefelsäure, Salzsäure und in Kalilauge und zwar in 10 % und 25 % dunkelgrün, 50 % dunkelgrün, schnell braun werdend. Aus der Ätherlösung scheiden sich rhombische Prismen und Nadeln aus. Die kristallinische Substanz läßt sich in reinem Zustande gewinnen, wenn man ein Blatt von Pr. obconica mit

[1]) A. Nestler, Das Sekret der Drüsenhaare der Gattung Cypripedium, Ber. deutsch. bot. Ges., 1907, XXV, S. 554.

[2]) H. Bachmann, Mortierella van Tieghemi nov. sp., Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, XXXIV, S. 277.

[3]) R. Kobert, Über Giftprimeln, Münch. med. Wochenschr., 1900, S. 1644.

[4]) A. de Bary, Vergl. Anatomie, 1877, S. 106.

[5]) A. Nestler, Die hautreizende Wirkung von Primula obconica und Pr. sinensis, Ber. deutsch. bot. Ges., 1900, XVIII, S. 189 u. 327, ferner: Hautreizende Primeln, Berlin 1904, Gebr. Borntraeger und: Die hautreizende Wirkung der Primula mollis Hook. und Pr. Arendsii Pax, Ber. deutsch. bot. Ges., 1908, XXVI, S. 468.

Äther flüchtig übergießt, den Äther verdunsten läßt und den Rückstand (300 μ lange Kristalle) in Uhrgläsern sublimiert (Sublimationstemperatur 110—115°). Sekret und Kristalle von Pr. obconica und Arendsii werden von konzentrierter Schwefelsäure langsam dunkelgrün gelöst, aus der Lösung scheiden sich tiefblaue Kristalle und Sphärokristalle ab. Cortusa Matthioli L. ist ebenfalls stark giftig, wie Nestler[1]) experimentell erwies. Auch hier tritt der Giftstoff im Sekret der (langgestielten) Köpfchendrüsen auf. In dem eingetrockneten fettartigen Sekrete finden sich farblose Kristalle, die zuweilen auf andere Teile der Blattepidermis verschleppt werden. Ob den Fettanteilen oder den Kristallen des Sekretes die Giftwirkung zukommt, bleibt unentschieden, „da hier die Kristalle nicht, wie bei Primula obconica, durch Sublimation isoliert werden können." Die Kristalle lösen sich in Alkohol und Äther (ohne beim Verdunsten der Lösung kristallinische Rückstände zu geben), in verd. Säuren, nicht in Wasser.

Die Überzüge der Gold- und Silberfarne sind weder Fette noch Wachse, sondern bei 140—160° schmelzende Körper von der Zusammensetzung $C_{18} H_{18} O_5$ und wahrscheinlich Substanzgemische[2]).

Wir dürfen uns nun nicht damit begnügen ein ätherisches Öl als solches im Gewebe mit Sicherheit zu diagnostizieren. Aufgabe der Mikrochemie muß es sein, auch die einzelnen Bestandteile der Öle zu ermitteln. Dann erst wird sich das Schicksal der ätherischen Öle im Pflanzenkörper ganz aufklären lassen. Denn die von Charabot und seinen Schülern gegebenen Deutungen über die Veränderung der ätherischen Öle müssen notwendigerweise eine mikrochemische Ergänzung erfahren. Die makrochemischen Befunde zeigen nur an, daß sich die Öle im Laufe der Vegetation verändert haben. Zu ermitteln bleibt, wo die Veränderung im Chemismus stattgefunden hat. Diese kann auch, entgegen Charabot, im Behälter selbst erfolgt sein. Die einzelnen Bestandteile der Öle (Terpene, Alkohole, Phenole, Aldehyde u. a.) können allerdings in wässeriger Lösung sowohl die Zellulosemembran- als auch „die lebende Plasmahaut äußerst leicht durchdringen", wie Overton angibt, der hiermit auch die Tatsache in Zusammenhang bringt, „daß in untergetauchten Wasserpflanzen ätherische Öle nicht aufzutreten pflegen".

Zur Ermittelung der einzelnen Bestandteile der Öle kämen basische Anilinfarben in Betracht. Overton[3]) hat auf Grund makrochemischer Versuche festgestellt, daß Terpene und Gemenge dieser beim Schütteln mit Methylenblau und Rosanilin (Chlorhydrate) in wässeriger Lösung

---

[1]) A. Nestler, Cortusa Matthioli L, eine stark hautreizende Pflanze, Ber. deutsch. bot. Ges., 1912, XXX, S. 330.

[2]) W. Zopf, Zur Kenntnis der Sekrete der Farne, Ber. deutsch. bot. Ges., 1906, XXIV, S. 264.

[3]) E. Overton, Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle, Zeitschr. f. wiss. Bot., 1900, XXXIV, S. 669

(1 : 50000) fast gar keinen Farbstoff aufnehmen (Terpentinöl, Origanumöl, Zitronenöl, Krummholzöl). Phenole nehmen jedoch den Farbstoff auf und färben sich um so intensiver, je konzentrierter die Phenollösung ist (Thymol, Eugenol, Thymian- und Nelkenöl, nicht Menthol). Phenoläther (Anisol, Anethol, Resorzindimethyläther, Hydrochinondimethyläther, also auch Anisöl, Bergamottöl) speichern nur wenig Farbstoff. Hingegen speichern aromatische Aldehyde (Benzaldehyd, Salizylaldehyd, Zimtaldehyd, auch Zimtöl) sehr leicht den Farbstoff aus Lösungen 1 : 100000. Vanillin nimmt die Farbstoffe leicht auf, weniger leicht Piperonal. Beim Schütteln der Farblösungen mit aromatischen Ketonen geht der größere Teil des Farbstoffes in die aromatische Phase über, so beim Kümmelöl (50 % Carvol). Auch Senföl färbt sich 30 mal stärker als das Wasser. Eine Durchprobung dieser Befunde auf mikrochemischem Gebiete wäre sehr erwünscht.

Von Perrot[1]) liegen in dieser Richtung schon Versuche vor. Er gebraucht zur Färbung „Violet de Paris" (ein Methylviolett). Der Farbstoff färbt in alkoholischer Lösung Membran und Protoplast, mit genügender Menge Essigsäure versetzt nur Sekrete (0,1 Violet de Paris, 10 ccm Eisessig, 100 ccm Alkohol (90 %), 90 ccm dest. Wasser: 10 ccm dieser Stammlösung mit 10 ccm Essigsäure und 80 ccm Alkohol (40 %) geben das Reagens). Mit diesem Reagens färben sich blau: Zimt-, Mentha-, Lavandula-, Anis-, Sternanis-, Senf-, Myristica-, ätherisches Mandel-, Gaultheria-, Geranium- und Kampferöl; außerdem werden Borneol, Eukalyptol, Thymol und Eugenol gefärbt. Nicht gefärbt werden Oleum pini, terebinthinae, citri, cedri, bergamotti, santali und balsami copaivae. Daher kann man sagen, daß reine Kohlenwasserstoffe und fette Öle nicht gefärbt werden, sondern nur diejenigen ätherischen Öle, welche Alkohole, Aldehyde oder Phenole enthalten.

In geeigneten Fällen kommen als Reagentien Phloroglucinsalzsäure (Czapek[2])) für Eugenol, Anethol u. a., Vanillinsalzsäure sowie Fuchsinschweflige Säure[3]) für Aldehyde in Betracht.

[1]) Em. Perrot, Ein neues Reagens auf ätherische Öle, L'union pharmacien, 1891, S. 253.

[2]) F. Czapek, Zeitschr. physiol. Chem., 1899, XXXVII, S. 151.

[3]) 2 ccm wässerige Lösung von saurem Natriumsulfit (spez. Gew. 1,27) und 100 ccm wässerige Fuchsinlösung (0,1 %) werden gemischt, nach 1 Stunde mit 1 ccm konz. Salzsäure versetzt und gut verschlossen aufbewahrt; oder man löst durch Anreiben 0,1 Fuchsin und 0.7 Natriumbisulfit in 88,0 Wasser, füllt in eine Glasstöpselflasche und setzt nach 1 Stunde 25 Tropfen konz. Schwefelsäure zu. Die Lösung muß farblos sein.

Harze.

Die Harz-Sekrete sind Körpergemische, deren Chemie erst in der Neuzeit geklärt wurde und eine eingehende Darstellung von Tschirch (Harze und Harzbehälter, 1906) erfahren hat. Zu den aus den Handelsharzen isolierten Körpern zählen: Harzalkohole, -ester, -säuren, Resene (indifferente, in Alkalien unlösliche Stoffe), aliphatische, glykosidische und gefärbte Harzkörper, ferner Gummi, ätherische Öle, flüssige aromatische Ester, aromatische Aldehyde, Enzyme, Bitterstoffe, Resinoide.

Der Pflanze dienen die Harze als Schutzmittel, vorzüglich als Wundschutzmittel (de Vries), wozu sie nicht nur durch ihre klebrige Beschaffenheit, sondern auch durch ihren Gehalt an antiseptischen Körpern (Benzoesäure, Zimtsäure) geeignet sind. Nicht nur die harzigen Sekrete normaler oder durch Wundreiz[1]) entstandener, endogener Behälter verkleben Wunden, sondern auch die harzigen Sekrete verschiedener Blattdrüsen (Grindelien, Eriodictyon).

Die Mikrochemie der Harze steht noch im Anfangsstadium, nicht einmal die Handelsprodukte sind mikrochemisch geprüft. Doch werden, wie orientierende Untersuchungen zeigen, viele der makrochemisch gefundenen Reaktionen leicht am Objektträger gelingen. Die Zusammensetzung, die das harzige Sekret innerhalb des Sekretbehälters hat, stimmt aber keineswegs völlig mit der des isolierten Handelsharzes überein. Beim Austritt des Sekretes aus dem Behälter (bei der Gewinnung, auch bei lysigener Erweiterung des Behälters) gelangen Inhalte benachbarter Gewebe in das Harz. Leichtflüchtige Anteile verdunsten, feste Anteile nehmen zu. Überdies finden selbst im isolierten Harze Umsetzungen statt, neue Körper entstehen (Vanillin in Asa foetida). Bei mikrochemischen Studien ist die Individualität der Pflanze zu berücksichtigen, sowie das Vegetationsstadium. Die größte Menge schleimiger Anteile findet sich nicht immer, wie die Literatur angibt, in jugendlichen Behältern, in denen die resinogene (schleimhaltige) Schicht doch am mächtigsten entwickelt sein sollte, sondern überwiegt zuweilen im Alter (Ferula, Exogonium). Zurzeit wissen wir nicht, ob alle und bis zu welchem Grade die von den Chemikern in den einzelnen Harzen aufgefundenen Körper auch im Sekretbehälter vorgebildet sind. Dies gilt von den Enzymen, Gummi, Aldehyden u. a. Es ist naheliegend, den Enzymen eine Rolle bei der Harzbildung zuzuschreiben. Im Präparate hat man Enzyme im Sekret noch nicht ermittelt. Die Harzbildung im Behälter verläuft wahrscheinlich in weit einfacherer Weise als wir annehmen. Ein großer Teil der die Harze bildenden Körper wandert in fertigem Zustande aus den benach-

[1]) Die Gesetze des Harzflusses sind von Tschirch ermittelt worden (s. Harze und Harzbehälter).

barten Zellen in den Behälter (Säuren, Aldehyde u. a.). Auch Magnesium kann sich bei der Harzbildung beteiligen, denn in den bisher näher studierten Objekten (Gingko, Ferula, Capsicum, Angelica, Exogonium u. a., abgesehen von den Milchröhren) sind im Sekret Magnesiumsalze aufgefunden worden (S. 123). Magnesium im Sekret ist sicher auffallend, denn die Pflanze pflegt mit diesem Element haushälterisch umzugehen. Die Mikrochemie wird die anorganischen Anteile der Sekrete ebenfalls berücksichtigen müssen.

Bei der Mannigfaltigkeit im Chemismus der Harze kann es kein für alle Harze brauchbares Reagens geben. Das Reagens (Kupferazetat), welches am ehesten Anspruch auf ein allgemein brauchbares Gruppenreagens machen kann, ist bei vielen Harzen noch nicht erprobt. Harze sind Gemische, die einzelnen Bestandteile der Gemische werden je nach ihrer Quantität die Reaktionen mehr oder weniger beeinflussen. Bei chemisch bereits näher studierten Harzen wird es ratsam sein, einen oder mehrere der charakteristischen Anteile nachzuweisen. Der Anfang in dieser Richtung ist bereits gemacht (Umbelliferon, Ferulasäure, Zimtsäure u. a.). Wesentlich erleichtert wird der Nachweis durch die Tatsache, daß Harz nur in ganz bestimmten Geweben (Behältern, Wundgeweben) aufzutreten pflegt. Relativ leicht gelingt es, Harz in frischen Pflanzen nachzuweisen.

Verfügt man über lebendes Material, dann wird das Sekret zunächst isoliert. Die Isolierung ist leicht durchführbar. Die Konsistenz des Harzes hängt oft vom Vegetationsstadium ab. Gewöhnlich liegen zähflüssige Substanzen vor. Es ist aber umständlich, mit zähflüssigen Körpern zu arbeiten, und selbst feste Harzmassen werden im isolierten Zustande bei den Reaktionen leicht fortgeschwemmt. Wir saugen daher das isolierte Harz in ausgekochte (wundfreie) Holundermarkscheiben auf. Mit diesen „Harzscheiben“ stellen wir die Vorprüfungen an. Nun werden die Reaktionen nicht mehr durch Gewebe und deren Inhalte beeinträchtigt, sie fallen reiner aus und sind sicherer. Als Lösungsmittel (teils unter Deckglas durchgesaugt, teils in Schälchen auf die Harzscheiben einwirkend) wenden wir die üblichen an (verdünnter Alkohol, absoluter Alkohol, Äther, Chloroform u. dergl.). In den meisten Fällen wird es sich um die Unterscheidung von Fett, Harz und ätherischem Öle handeln. Ätherische Öle werden durch Mikrodestillation (S. 228) in 3 Minuten (bei festen Harzen in 5—8 Minuten) entfernt. Die vom ätherischen Öle befreiten Scheiben werden mit Kalilauge-Ammoniak oder mit Ammoniak auf Fett geprüft (S. 162), sowie mit Kupferazetat mazeriert und mit Farbstoffen gefärbt (s. weiter unten). Schließlich kann S c h w e f e l s ä u r e benutzt werden. Harze, die keine Fette führen und von ätherischem Öle befreit sind, geben mit Schwefelsäure

niemals jene glänzenden Tropfen, die für Fette und Öle (S. 167) charakteristisch sind. Die vom ätherischen Öle befreiten Harze lösen sich in der Säure (ev. schwach erwärmen), meist mit kräftigen Farben (gelb, braun, rot) teils vollständig, teils unter Abscheidung eines feinen voluminösen, seltener körnigen Gerinnsels (violettschwarz Tolubalsam, tiefschwarz Sagapen, hellrot Galbanum, olivbraun Opopanax, weißlich Euphorbium) oder schleimiger formloser Ballen (Euphorbium). Bei starker Vergrößerung finden sich in den Niederschlägen kleine helle Tröpfchen, die aber nie ineinanderfließen und sich vergrößern, wie es Fetttropfen tun. Phytosterine geben gleichfalls nicht derartige Tropfen.

Silbernitrat[1]), das harzsaures, in Äther lösliches Silber bildet, während fettsaures Silber in Äther unlöslich ist, gibt keine eindeutigen Resultate am Objektträger; die Methode wurde nur zum makrochemischen Nachweis empfohlen.

Die erhaltenen Reaktionen werden an Schnitten nachgeprüft. Es sind vorteilhaft möglichst kleine Schnitte zu wählen, die nur die nötigen Zellen enthalten. Die vom ätherischen Öle befreiten Schnitte werden auf Fette geprüft und mit Kupferazetat behandelt.

Kupferazetat, sachgemäß angewandt, ist ein recht brauchbares Reagens zum Nachweis der Harze. Die Reaktion besteht in einer Grünblaufärbung, die auf chemischen Umsetzungen beruht. Das Reagens hat Franchimont[2]) eingeführt, nachdem er mit der Hansteinschen Anilinlösung (s. S. 236) keine brauchbaren Resultate erhalten hatte, sondern nur „verschieden schillernde Farben auf allen möglichen Geweben". Größere Pflanzenstücke werden wenigstens einen Monat lang in einer konzentrierten wässrigen Lösung von Kupferazetat mazeriert. Alsdann wird das Reagens, welches auch als Unverdorben-Franchimontsches bezeichnet wird, gut mit fließendem Wasser ausgewaschen. Aus dem Material werden die Präparate hergestellt, welche sich in Glyzeringelatine einschließen lassen und das Harz in smaragdgrüner Färbung zeigen. Mazeriert man kürzere Zeit, wie Franchimont (6 Tage) oder Schwabach (10 Tage) angeben, dann erhält man überwiegend nur eine gelbliche Färbung, die zumal in chlorophyllhaltigen Geweben sich nicht genügend scharf abhebt; außerdem wird das Harz erst bei längerer Mazeration gut gehärtet. Oft ist Erwärmen, selbst Aufkochen in der Lösung zu empfehlen.

Viele Mißerfolge mit diesem Reagens sind sicher darauf zurückzuführen, daß die Kupferlösung nicht genügend lange einwirkte. Ob

---

[1]) Th. S. Gladding, Quantitative Scheidung des Harzes von Fetten, Amer. chem. journ., 1882, III, S. 416.

[2]) Franchimont, Beiträge zur Entstehung und chemischen Zusammensetzung der sogenannten Terpenharze, Leiden 1871, S. 41.

sich alle Harze färben, ist noch nicht ermittelt: jedenfalls werden alle Harze von saurem Charakter reagieren, die Kupfersalze der Harzsäuren bilden. Nun verlangt die Reaktion eine vorsichtige Beurteilung und eine weitere mikrochemische Kontrolle, denn auch Fettsäuren geben blaugrüne Salze. So ist die Blaufärbung des Sekretes von Capsicum (s. Capsaicin) auf die Anwesenheit von Fettsäuren zu setzen und die von Schwabach[1]) beobachteten Färbungen in den Epithelzellen der Coniferengänge scheinen ebenfalls auf Fette hinzuweisen, zumal die Verfasserin selbst sagt: „Auch die Epithelzellen waren teilweise gefärbt. Bei letzteren allerdings war die Färbung nie so intensiv, wie die des Harzes, das sich im Kanal befand.“ Die Grünfärbung des Harzes von Polyporus officinalis wird fast ausschließlich durch die Agaricinsäure (S. 152) bedingt.

Die Reaktion läßt sich zur Unterscheidung der Agaricus-Droge von seiner Verfälschung, den Fruchtträgern von Polyporus sulfureus Fr., benutzen. Während P. off. schon nach 5tägiger Mazeration tiefblaugrüne Stücke gibt, bleibt der harzarme P. sulfureus selbst nach monatelanger Mazeration ungefärbt (Tunmann, Schw. Wochenschr., 1909).

Bei ätherischen Ölen gelingt die Reaktion nicht oder sie ist undurchführbar. Letzteres ist bei vielen Epidermaldrüsen der Fall. Bei verschiedenen Labiaten fand ich nach 14 Tagen noch keine Färbung; bei längerem Liegen der Objekte in Kupferazetat wird meist die Kutikula gesprengt und das flüssige Sekret fließt ab. Bei den Kompositen war das Sekret nach 2 Monaten wohl gehärtet, aber nicht gefärbt. Zu versuchen wäre Dauerbeobachtung zugekitteter Deckglaspräparate.

Kupferoxalat in heißer konzentrierter wässeriger Lösung hat Zalewski[2]) angewandt zum Nachweis der Harzfüllung der Resinozysten der Begonien. Doch mußten die Präparate auf dem Objektträger in oxalsaurem Kupfer auf über 100° erhitzt werden. Beim Schmelzen des Harzes trat die smaragdgrüne Farbe hervor, die sich in Glyzerin gut hielt. (Eine Behandlung mit Kupferoxalat bei Zimmertemperatur hatte selbst nach 2 Monaten keinen Erfolg.)

Zur Färbung der Harze werden vorzugsweise Alkanna und Osmiumsäure herangezogen, wie es scheint besonders deshalb, weil

---

[1]) E. Schwabach, Zur Kenntnis der Harzabscheidungen in Coniferennadeln, Ber. d. bot. Ges., 1899, XVII, S. 291.

[2]) A. Zalewski, Über M. Schönnetts Resinozysten, Bot. Zentralbl., 1897, LXX, S. 50. Resinozysten nannte Schönnett halbkugelförmige der Wand inserierte Gebilde, die im Stengel, Blattstiel und Blatt einer Begonie auftreten und aus einem radial lamellierten Kopf bestehen. Zwischen den Lamellen soll nun ein festes Harz abgelagert sein, das sich in Alkohol, Äther, Schwefelkohlenstoff, Benzol, Chloroform, Terpentinöl, Xylol löst, mit Osmiumsäure schwärzt, mit Alkanna rötet.

diese Reagentien zu dem eisernen Bestande eines jeden Mikroskopikers gehören und daher jederzeit zur Hand stehen. Selbstredend können alle Fett- und Korkfarbstoffe benutzt werden. An dieser Stelle erscheinen einige Bemerkungen über die Alkannafärbung sowie über das Hansteinsche Anilingemisch angebracht.

Der Farbstoff der Alkannawurzel wurde in der mikroskopischen Technik zuerst von Waldeyer[1]) benutzt. Gute Dienste leisteten auf tierhistologischem Gebiete Lösungen von Alkanna in Terpentinöl. Bald darauf gebrauchte N. J. C. Müller[2]) die Alkannawurzel zum Nachweis von Harzen; er verfuhr in folgender Weise: Zu dem im Wasser liegenden Präparate wird ein kleines Stückchen pulverfreier Alkannaborke gelegt; dann „bringt man auf beide ein dünnes Deckgläschen und gibt an dessen Rand einen kleinen Tropfen Alkohol; nach 2—3 Minuten entfernt man das Borkestückchen". Die Harze werden tiefrot gefärbt. Die Methode ist etwas umständlich, sie wird in dieser Form gegenwärtig nicht mehr benutzt.

Dippel[3]) führte 1882 die weingeistige Alkannatinktur ein. die er als Tinktionsmittel für Harze und Fette gebraucht, die auch Kautschuk, verkorkte und kutinisierte Membranen färbt. Bei Anwendung dieser Tinktur treten gewöhnlich störende Ausscheidungen des Reagens auf. Diese kann man umgehen, indem man die Alkannatinktur im Reagensglase mit soviel Wasser verdünnt bis die Flüssigkeit noch klar und durchsichtig erscheint (Tunmann, Lit. S. 222, $_3$). Jetzt steigert man die Wirkung durch Zusatz von Essigsäure und stellt die Lösung teils aus der Wurzel, teils aus dem käuflichen Alkannin her. Durch die Essigsäure wird die Lösung überdies haltbar; hierauf wies zuerst Guignard[4]) hin, der 10 g Alkannapulver mit 30 ccm absolutem Alkohol mazeriert und das Filtrat an einem warmen Orte eindunsten läßt. Der Rückstand wird in 5 ccm Eisessig und 50 ccm 50⁰/₀igem Alkohol aufgenommen und die Lösung nach dem Absetzen filtriert. Chimani[5]) geht vom Alkannin aus, löst dieses in Äther, dampft den Ätherauszug ein und nimmt den Rückstand (zum Kautschuknachweis) in 45⁰/₀iger Essigsäure auf. Die Schnitte sind vorteilhaft mit verdünnter Essigsäure anzusäuern. Auch zur Harzfärbung ist diese Lösung brauchbar, zuweilen ist aber eine schwächere Essigsäure angebracht. Zum Aus-

[1]) Waldeyer, Ztschr. für rationelle Med., 1863, XX, S. 200.

[2]) N. J. C. Müller, Untersuchungen über die Verteilung der Harze, ätherischen Öle, Gummi und Gummiharze und die Stellung der Sekretbehälter im Pflanzenkörper, Jahrb. f. wiss. Bot., 1866, V, S. 387.

[3]) L. Dippel, Das Mikroskop, 1882, II. Aufl., S. 721.

[4]) L. Guignard, Journ. de Bot., 1890, IV, S. 447.

[5]) O. Chimani, Untersuchungen über Bau und Anordnung der Milchröhren, Berner Dissertation, 1895, S. 25; Bot. Centralbl., 1895, LXI, S. 305.

waschen und Einlegen dienen verdünnter Alkohol oder Glyzerin. In Glyzerin- und Gelatine-Präparaten habe ich die Alkanninfärbung nicht haltbar gefunden; in einigen Wochen wird sie bräunlich und verblaßt schließlich ganz.

Das Hansteinsche Anilingemisch (Lit. S. 221, 1, Fuchsin und Methylviolett zu gleichen Teilen in 50 %igem Alkohol) ist nicht zu empfehlen und wird in neuerer Zeit nur selten benutzt. Harz soll blau, Schleim fleischfarben, Gummi rot und Plasma violett werden. Doch sind die Farbenunterschiede so gering, daß ein jeder die Färbung herausfinden kann, welche er anzunehmen gewillt ist. Auch hat mich die Erfahrung gelehrt, daß verschiedene Beobachter ein und denselben Farbeton verschieden auffassen. Kritische Nachprüfungen in letzter Zeit haben die Unbrauchbarkeit des Reagens zur Differentialdiagnose dargetan: „Verholzte und kutinisierte Membranen werden violett bis blau und die rote Färbung der Zellinhalte wird nicht allein durch Schleim und Gummi bedingt, sondern durch die saure Reaktion des Zellsaftes, während der sich kontrahierende Plasmakörper infolge seiner alkalischen Reaktion violett bis blau färbt" (Tunmann). Dann entstehen bald Mischfarben. Mit diesem Färbungsmittel wurden schon Staubansammlungen, also anorganische Stoffe, für Harz gedeutet (Lit. S. 222, 4).

Weitere Prüfung verdient die Beobachtung von Schenck[1]), daß sich bei vielen Pflanzenhaaren zwischen Kutikula und der Zellulosewand eine Schicht findet, die in Salz- und Salpetersäure aber nicht in Wasser quillt und die für einen harzartigen Körper angesprochen wird.

Der klebrige Überzug der Pollenkörner wird ebenfalls als Harz angesprochen. Lopriore[2]) hielt ihn bei Araucaria Bidwillii für Harz, da er sich in Alkohol leicht löste und mit Alkanna färbte. Küstenmacher[3]) findet ganz allgemein, daß die Tapetenzellen und ihr Inhalt in meist gelbe bis rote, selten farblose Harzbalsame übergehen („lysigene Exkretbehälter"), welche die Pollenkörner bedecken. Dieser Balsam löst sich in Alkohol, Olivenöl, reagiert mit Osmiumsäure und mit Kupferazetat. Von Helianthus annuus wurde eine größere Menge Balsam dem Pollen durch Abspülen mit Äther entzogen. Der so gewonnene Balsam löste sich orangegelb in Alkohol; die Lösung trübte sich erst bei Zusatz von 40 % Wasser (Unterscheidung von Fett). Beim Erhitzen entweicht ein ätherisches Öl (am Geruch zu erkennen, s. S. 221)

[1]) H. Schenck, Unters. über die Bildung von zentrifugalen Wandverdickungen an Pflanzenhaaren und Epidermis, Dissert. Bonn, 1884.

[2]) G. Lopriore, Über die Vielkernigkeit der Pollenkörner und Pollenschläuche von Araucaria Bidwillii Hook., Ber. d. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 335.

[3]) M. Küstenmacher, Propolis, Ber. d. pharm. Ges., 1911, XXI, S. 65.

und zurück bleibt ein gelbrotes Harz, das sich in Schwefelsäure braunrot löst (Fette würden Tropfen bilden).

Bei Pilzen tritt häufig Harz auf. Bei fortschreitender chemischer Erkenntnis werden die Pilzharze sich zum Teil als gut charakterisierte Säuren (Agaricinsäure) herausstellen. Daher ist es erklärlich, daß sie nach eigenen Erfahrungen meist mit Kupferazetat tiefgrün reagieren. Das Harz der Pilze entsteht in besonderen Harzhyphen, exogen und endogen. Die peripher gelegenen Harzhyphen erzeugen ähnlich wie die Epidermaldrüsen glänzende Harzüberzüge, die v. Wettstein[1]) bei Polyporus australis Fr. und laccatus näher untersuchte. Bei jugendlichen Drüsen ist das Sekret flüssig, bei alten fest. Die endogenen Harzhyphen unterscheiden sich bereits durch ihre unregelmäßige, bizarre Gestalt von den normalen Hyphen. Die Harzproduktion kann so reichlich sein, daß die Wände gesprengt werden, große Destruktionslücken entstehen und das Harz auch an sekundäre Lagerstätten gelangt (s. Agaricinsäure, S. 152). Bei der Aufhellung leistet Ammoniak zuweilen treffliche Dienste. Vornehmlich bei Basidiomyceten treten Harzhyphen auf[2]). Bei Tuber excavatum und Hymenogaster decorus konnte Buchholz[3]) das „Gummiharz" mit Corallinsoda färben. (Über Schleimhyphen s. Schleimmembran.)

Wohl immer wird auch bei den Pilzen mit der Harzbildung eine Schleimerzeugung Hand in Hand gehen. Die Schleimbildung kann sogar, ebenso wie bei den Drüsen höherer Pflanzen, überwiegen. So sondern die Trichomhydathoden (papillöse, schlauchartige Gebilde), die auf verschiedenen Hymenomyceten, teils auf der sterilen Oberfläche des Fruchtkörpers, teils auf dem Hymenium vorkommen, nach Knoll[4]) große schleimige Tropfen ab. „In dem Schleim scheiden sich dann vielfach Kalziumoxalat oder harzähnliche Substanzen aus." — Nach Trotter[5]) besteht der glänzende Überzug mancher Eichengallen aus Harz; er löst sich in Äther, Schwefelkohlenstoff und Chloroform, wird mit Schwefelsäure braun, mit Alkanna rot, mit Kupferazetat grün. Das Harz ist das Produkt dicht stehender Epidermaldrüsen.

---

[1]) R. v. Wettstein, Neue harzabsondernde Organe bei Pilzen, Sitzb. zool.-bot. Ges., Wien, 1885, XXXV, Sep.

[2]) G. v. Istvánffy, Études relatives à l'anatomie physiolog. des champignons, Budapest 1896.

[3]) F. Buchholz, Zur Entwicklungsgeschichte der Tuberaceen, Ber. d. bot. Ges., 1897, XV, S. 211.

[4]) F. Knoll, Über die Abscheidung von Flüssigkeit an und in den Fruchtkörpern verschiedener Hymenomyceten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1912, XXX, S. (36).

[5]) A. Trotter, Contributo alla conoscenza del sistema secretore in alcuni tessuti prosoplastici, Ann. di Botan., 1903, I, S. 123.

Die „anormale Harzbildung" in Gefäßen einer Rheumart, über die Koningsberger[1]) berichtet, ist jedenfalls nur eine bassorinartige Ausfüllung, in der sich Farbstoffe und Oxymethylanthrachinone speichern. Das Produkt zählt somit zu den Kerngummiharzen, die wir vorzüglich bei den Farbhölzern, aber auch sonst im Kern- und Wundholz antreffen. Nach Tschirch[2]) entstehen diese „in dem zarten Plasmareste, der die Wand der Tracheiden, Tracheen, Markstrahlenzellen und Libriformfasern auskleidet". Bei Haematoxylon campechianum, Pterocarpus, Caesalpinia echinata und anderen Farbhölzern hat Will[3]) die Lösungsverhältnisse dieser Füllmassen näher studiert. Die Massen in den Parenchymzellen, Markstrahlen, Libriformfasern und Tracheiden waren nicht so resistent gegen Lösungsmittel wie die der Gefäße. Eisessig, Äther, Mineralsäuren, selbst Chloralhydrat, meist auch Kalilauge sind ohne Einwirkung. Die Massen lösen sich in Alkohol, wenn die Schnitte mit chlorsaurem Kali-Salpetersäure (in der Kälte) zuvor mazeriert wurden. Nach Tschirch besteht das Kerngummiharz, Wundharz oder Kerngummi aus einem Gemisch aus Gummi und Harz in wechselndem Verhältnis. Bei Umbelliferen (Ferula, Gentiana) fand ich außerdem Fettsäuren.

Einige Bestandteile der Sekrete.

Alantsäureanhydrid.

Alantsäureanhydrid, Alantolakton, wird durch Destillation der Wurzel von Inula helenium gewonnen und bildet farblose Kristallnadeln, die bei gelindem Erwärmen sublimieren.

In den schizogenen Gängen der Wurzel von Inula helenium scheiden sich beim Trocknen kristallinische Massen ab. Die Kristalle sind nicht immer gut wahrnehmbar, treten aber beim längeren Liegen der Präparate in Wasser besser hervor. Vogl[4]) hielt sie für Alantkampfer. Nach Tunmann[5]) lassen sie sich stets bei nachfolgendem Zusatz von etwas verdünnter Salpetersäure sichtbar machen. Gut entwickelte Kristalle finden sich in jedem Handelspulver und zwar derart zahlreich, daß sie neben dem Inulin die Diagnose gestatten. Der

[1]) J. C. Koningsberger, Eine anatomische Eigentümlichkeit einiger Rheum-Arten, Bot. Ztg., 1893, LI, S. 85.

[2]) A. Tschirch im Anatom. Atlas, Nachträge.

[3]) A. Will, Beitr. z. Kenntn. von Kern- und Wundholz, Berner Dissertation 1899.

[4]) A. Vogl, Kommentar der 7. Ausgabe der österr. Pharmakopöe, 1892, S. 391.

[5]) O. Tunmann, Über die Kristalle in Radix Helenii, Pharm. Centralhl., 1912, LIII, S. 1175.

kristallinische Körper ist Alantsäureanhydrid (Fig. 62). Die Kristalle sind teils nadelförmig, teils flach rhombisch, bis 150 μ lang und 5—10 μ breit, löschen schief aus und polarisieren in grauen Farben. Sie lösen sich unter Deckglas nicht in kaltem Wasser, leicht in heißem Wasser (Unterschied von Alantkampfer), ferner in Alkohol, Äther, Alkalien (in der Wärme) und in verdünnten Säuren. Bei Zusatz von reichlich Chlorzinkjod gehen sie in rote Tropfen über (wahrscheinlich die Jodverbindung des Anhydrids); es kommt aber nicht zur Abscheidung eines kristallinischen Produktes. Die Jodfärbung des Sekretes von Inula helenium wird daher durch dieses Anhydrid hervorgerufen (s. S. 225). Erwärmt man Schnitte oder das Pulver mit verd. Natronlauge, so scheiden sich nach einigen Stunden Kristallbündel von alantsaurem Natrium ab. Das Natriumsalz erhält man auch durch Aufkochen mit Natriumnitrit. Erwärmt man die Objekte einige Minuten in Wasser und fügt verdünnte Säure (Schwefelsäure) zu, dann kommt es zur Abscheidung von Nadeln der Alantsäure. Diese könnte man leicht für Gipskristalle halten. Sie sind aber an den Enden meist gerade abgestutzt, lösen sich ungemein leicht in Wasser, schon bei kräftigem Anhauchen und unterscheiden sich hierdurch vom Gips und dem Alantsäureanhydrid. Trotzdem das Anhydrid schon bei gelindem Erwärmen unzersetzt sublimiert, hat die Mikrosublimation unbrauchbare Ergebnisse. In der trockenen Wurzel verflüchtigt sich der Körper teilweise aus den Sekretgängen und gelangt an sekundären Lagerstätten (Parenchym), sogar auf der Oberfläche der Wurzel zur Kristallisation.

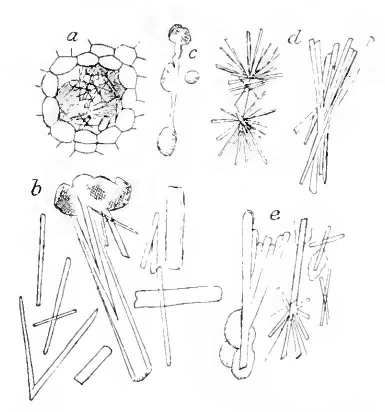


Fig. 62. Inula helenium (Wurzel, Droge), Alantsäureanhydrid: *a*) im Sekretgang eines Schnittes, *b*) im Handelspulver; *c*) mit Chlorzinkjod rote Tropfen (Jodverbindung); *d*) mit Natronlauge alantsaures Natrium; *e*) mit stark verd. Mineralsäure Kristalle von Alantsäure (Tunmann).

Asaron.

Asaron (Asarin, Asarumkampfer, Trimethoxyl-propenylbenzol) ist im ätherischen Öl von Asarum europaeum (hauptsächlich Rhizom), von Acorus calamus (Rhizom) und Piper angustifolium-Arten (Blätter) enthalten. Bei der Destillation frischer Asarum-Wurzel mit Wasserdampf scheidet sich Asaron in monoklinen Kristallen aus, die leicht in Äther, Chloroform, Essigsäure und Alkohol löslich sind, sich aber kaum in Wasser lösen. Asaron ist in der Pflanze nur im ätherischen Öl der Ölzellen lokalisiert, scheidet sich beim Trocknen der Pflanzen nicht kristallinisch ab.

Zum Nachweis gebrauchte Borscow[1]) konzentrierte Schwefelsäure. Die Ölmasse der Präparate, auch die isolierte Substanz, wird gelb, schließlich orange. Hiermit ist die Mikrochemie noch nicht geklärt. Beim Aufkochen oder beim Erwärmen der Präparate von Asarum europaeum (Rhizom) mit wässeriger Chloralhydratlösung erhielt ich stets charakteristische Kristalle (Täfelchen), die sich in Wasser wiederum in feine Öltröpfchen auflösten. Die Kristalle entstanden auch in Präparaten, die vorher einige Tage in wenig Wasser gelegen hatten (zur Entfernung wasserlöslicher Salze), blieben aber an Alkoholmaterial aus. Möglicherweise liegt eine Asaronverbindung vor, doch bedarf der Befund weiterer Nachprüfung (Fig. 63). Sublimation und Mikrodestillation (S. 227) geben Tropfen von ätherischem Öle, die stark nach Moschus riechen. Die Ausscheidung von Asaron erfolgt bei Anwendung einiger Schnitte aber so spärlich und erst nach 1—2 Tagen, daß die Reaktion ziemlich wertlos ist. Erwärmen der Schnitte mit Brombromkalium führt das Öl der Ölzellen nur in braune Massen über; alkoholische Kalilauge, ebenso konzentrierte Salzsäure färben rötlich. Bringt man einige Schnitte in wenig Chloroform und setzt das Präparat (als Hängetropfen) Bromdämpfen aus, dann scheiden sich (außerhalb der Zellen) kleine kurze Nadeln aus, die wahrscheinlich das Bromid darstellen.

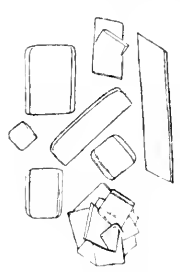


Fig. 63. Asarum europaeum, Kristalle nach Erwärmen der Schnitte in Chloralhydrat (Asaronverbindung?) (Tunmann).

Betuloresinsäure.

Aus dem Sekret der Epidermaldrüsen der Knospen und jungen Blätter von Betula alba ist die Betuloresinsäure isoliert worden, die aber nur sehr ungenügend studiert ist. Sie löst sich, ebenso wie das ganze Sekret, leicht in Äther, Alkohol, Alkalien und färbt sich mit Schwefelsäure rot. Die Schwefelsäure-Reaktion hat Behrens[2]) mikrochemisch benutzt. Junge Knospen (April) zeigten ein farbloses Sekret, das mit Vanillinsalzsäure nicht reagierte. Mit Schwefelsäure trat zunächst gelbe Färbung ein, erst nach einigen Minuten erschien die rote Farbe. Die im Gewebe gleichfalls eintretende Rotfärbung ist auf den Zuckergehalt zurückzuführen und unterbleibt, wenn die Präparate zuvor gut ausgewaschen wurden. Betuloresinsäure ist nur im Sekret und nicht im Inhalte der Drüsenzellen lokalisiert. Bei der Mikrosublimation erhält man ein sehr schlecht kristallinisches Sublimat. Da Schwefelsäure in diesem zuerst intensive Chromgelbfärbung, dann Rötung hervorruft, so scheint die Säure sublimierbar zu sein.

[1]) El. Borscow, Beiträge zur Histochemie der Pflanzen, Bot. Ztg., 1874, XXXII, S. 17.

[2]) W. Behrens, Hilfsbuch zur Ausführung mikr. Untersuch., Braunschweig, 1883, S. 379.

Capsaicin.

Capsaicin, das scharfe Prinzip der Capsicumfrüchte, im spanischen Pfeffer zu 0,03, im Cayennepfeffer zu 0,15 % enthalten, ist nach Thresh[1]) stickstofffrei. Neuerdings schreibt ihm Nelson (Chem. Ztg., 1910, XXXIV, Rep. S. 599) Phenoleigenschaften und einen Stickstoffgehalt zu. Ein Tropfen einer Lösung 1 : 100000 erzeugt auf der Zunge anhaltendes Brennen. Aus Petroläther umkristallisiert bildet es kleine Täfelchen; es ist leicht flüchtig und in Alkohol und Alkalien löslich.

Die Lokalisation des Capsaicins wurde von A. Meyer[2]) aufgeklärt, von Molisch weiter verfolgt. Gruppen von Epidermiszellen der Scheidewände strecken sich und werden zu Sezernierungszellen; dann verdickt sich die Außenmembran, die Kutikula wird abgehoben und in dem subkutikularen Raum sammelt sich das capsaicinhaltige Sekret in Tröpfchen an. Das Sekret wird durch Kupferazetatlösung grün gefärbt[3]). Zusatz von Kalilauge löst das Sekret, und momentan scheiden sich aus der Lösung zahlreiche 4—6seitige Täfelchen von Capsaicinkalium (Fig. 64) aus[4]). Von dem scharfen Geschmack des Capsaicins kann man sich leicht überzeugen, wenn man eine Spur des Sekretes mit der Nadel herauspräpariert und auf die Zunge bringt. Die Grundsubstanz des Sekretes ist ein fettes Öl, wie Pabst[5]) makrochemisch ermittelte (Capsaicin soll nach diesem Autor eine Harzsäure sein und „innig gemengt“ mit freien Ölsäuren auftreten) und später Nestler[6]) an den Myelinbildungen feststellen konnte (S. 164). Durch Einreißen der Drüsenkutikula gelangt das capsaicinhaltige Sekret, besonders bei getrockneten Früchten, auch auf andere Gewebe der Früchte[7]).

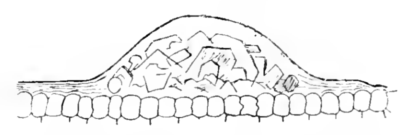


Fig. 64. Drüsenfleck von Capsicum annuum, Capsaicinkalium (mit Kalilauge) (Tunmann).

---

[1]) J. C. Thresh, Pharm. Journ. and Trans., 1876, I, S. 941.

[2]) A. Meyer, Pharm. Ztg., 1889, XXXIV, S. 130 u. Wissenschaftl. Drogenkunde II, S. 418.

[3]) O. Tunmann, Dissert. 1900, S. 10.

[4]) H. Molisch, Histochemie, Jena 1891, S. 54.

[5]) Th. Pabst, Zur chemischen Kenntnis der Früchte von Capsicum annuum, Arch. d. Pharm., 1892, CCXXX, S. 108.

[6]) A. Nestler, Zur Kenntnis der Fructus Capsici, Ztschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm., 1906, Nr. 11.

[7]) So sagt die Literatur. Da aber Capsaicin sehr leicht flüchtig ist, so ist meiner Ansicht nach ein Transport dieses Körpers durch intakte Drüsen und kutikularisierte Membranen an sekundäre Lagerstätten sehr leicht möglich (wie beim Kampfer oder Alantolakton u. a.). Derart würden sich auch die Angaben

Cubebin.

Cubebin (Methylenäther des 3-4-Dioxy-Zimtalkohols) ist neben Harz- und Cubebensäure im Sekret der Ölzellen von Cubeba officinalis Miq. zu 2,5% enthalten und bildet im gereinigten Zustande nadelförmige Kristalle, die sich leicht in Chloroform und Eisessig, schwer in Alkohol, fast gar nicht in Wasser lösen. Cubebin vertritt die Alkaloide, welche für die Piperaceen charakteristisch sind. Es findet sich in den Ölzellen der Früchte (Perikarp und Perisperm) und in geringer Menge in der Fruchtspindel, während nach Peinemann[1]) die Ölzellen von Wurzel, Stamm, Blattstiel und Lamina frei von Cubebin sind.

Cubebin läßt sich mikrochemisch mit Schwefelsäure (purpurviolette Färbung) nachweisen. Es ist ratsam, die Schnitte direkt in die Säure einzulegen: die Färbung ist dann besser auf die Sekretzellen beschränkt. In der Droge (Früchte) wird das gesamte Gewebe mehr oder weniger rot und rote Streifen fließen ab, da das Cubebin das Gewebe infiltriert hat. Nach Linde kann die konzentrierte Säure mit 25—50% Wasser verdünnt werden. Die Reaktion dient zur Unterscheidung von den sog. „falschen Cubeben", die der Handelsware untergeschoben werden (die anatomischen Charaktere reichen zur Diagnose nicht aus). Das Pseudocubebin von Piper Lowong Bl. wird mit Schwefelsäure nur gelbbraun. Cubebin, das sich zuweilen in Nadeln abscheidet, wird ferner von Ammoniummolybdat-Schwefelsäure blau. „Durchtränkt man den Schnitt mit einer Ammoniummolybdatlösung, saugt ab und läßt dann konzentrierte Schwefelsäure zufließen, so erscheint die Färbung tiefblau. Diese Cubebinreaktion habe ich bei weitaus der überwiegenden Zahl der Cubebinfruchtschalen erhalten. Nur in verschwindend wenigen Fällen blieb sie aus." (A. Tschirch, Anatom. Atlas, S. 333.) Eine rotviolette Färbung entsteht ferner, wenn man „die Schnitte auf dem Objektträger mit etwas Phosphorsäureanhydrid bedeckt, einige Zeit an freier Luft liegen läßt, bis dasselbe etwas Feuchtigkeit angezogen hat." (Peinemann.) Die drei genannten Reaktionen treten in ähnlicher Weise mit Piperin ein. Die hierbei bei beiden Körpern auftretenden Farbentöne lassen sich nur in vitro sicher erkennen. Es gelang mir nicht, Cubebin im Pulver durch Chloroform, Alkohol oder alkoholische Kalilauge zur Kristallisation zu bringen. Cubebin reagiert nicht mit Chloralhydrat (im Gegensatz zu Piperin, s. Alkaloide).

---

von Istvanffy (Just bot. Jahresber., 1891, I, S. 65) und Guillard (Les piments des Solanées. Thèse, Paris, 1901) erklären lassen, nach denen Capsaicin auch im Collenchym der Scheidewände und im Samen auftreten soll.

[1]) K. Peinemann, Beiträge zur pharmakognostischen und chemischen Kenntnis der Cubeben und der als Verfälschung derselben beobachteten Piperaceenfrüchte, Arch. d. Pharm., 1896, CCXXXIV, S. 204.

Eriodictyonon.

Eriodictyonon wurde von **Mossler** (Ztschr. öst. Ap. Ver., 1907, LI, S. 135) aus Eriodictyon glutinosum isoliert und aus dem ätherischen Auszuge mit Soda als gelbes Salz erhalten. Frühere Bearbeiter haben aus dem alkoholischen Auszuge Eriodictyonsäure (gelbe Blättchen, die an der Luft rot werden) gewonnen.

Die angeführten Körper können nur im Sekret der Hautdrüsen (Abb. s. resinogene Schicht) zugegen sein. Das harzige Sekret überzieht die vegetativen Teile der Eriodictyonarten (glutinosum, tomentosum, angustifolium) als mächtige (bis 100 μ hohe) Schicht, welche eine schwach gelbliche Masse darstellt: sie löst sich leicht in Chloralhydrat, Äther, Alkohol u. a. Auch Anilin löst sofort. Schwefelsäure löst rotgelb unter Abscheidung eines Gerinnsels. Ammoniak löst hellgelb, es fällt nach einigen Stunden ein hellgelber Niederschlag aus. Beweisend ist die Reaktion mit Sodalösung (20—30 %); das Sekret löst sich unter Abscheidung eines tiefgelben voluminösen Niederschlages, der an der Luft langsam rotgelb wird. In dem Gewebe entsteht **keine** Reaktion, doch müssen die Schnitte direkt in die Lösungen eingetragen werden. Beim Durchsaugen oder beim Zusetzen der Reagentien zu Wasserpräparaten kann der Niederschlag in die Epidermis eindringen. Man kann auch das Sekret von der Blattfläche abschaben und dann das Sekret sowie das sekretfreie Blattgewebe gesondert untersuchen. Die von **Mossler** gefundenen Fettsäuren sind **nicht** (oder doch nur in Spuren) im Sekret enthalten, sondern entstammen dem Gewebe (und vielleicht auch der stark verdickten Kutikula).

Eugenol.

Eugenol (Eugensäure, Nelkensäure, Allylguajakol) von **Bonastre** 1827 isoliert, eine gelbliche, nach Nelken riechende Flüssigkeit, ist in Alkohol, Äther, Eisessig leicht löslich, in Wasser unlöslich, liefert mit Kalilauge kristallinisches Eugenolkalium, wird (in alkoholischer Lösung) mit Eisenchlorid blau, mit Phloroglucinsalzsäure rötlich. Eugenol findet sich in vielen Sekreten, so im öligen Sekret von Eugenia caryophyllata, Pimenta officinalis, Cinnamomum-Arten, Illicium religiosum (Früchte), Sassafras officinale (Rinde), Ocimum basilicum u. a. Es tritt somit vorzugsweise in Ölzellen und nur selten in Epidermaldrüsen auf (Ocimum). Beim Trocknen dringt es aus den Ölzellen in das benachbarte Parenchym. Der Eugenolgehalt der Nelkenöle schwankt (79—87 %). Im Öl von Thea sasanqua sind 97 % Eugenol. Zum Teil ist der Gesamtgehalt an Eugenol von der Menge des ätherischen Öles abhängig; Nelken führen 17—22, Nelkenstiele 5,8—6,7, Nelkenfrüchte 2,2—9,2 % ätherisches Öl. In glykosidischer Bindung ist Eugenol in Geum urbanum (Wurzel) beobachtet worden; dort wird es erst durch Enzyme abgespalten.

16*

Den Eugenolnachweis mit Kalilauge führte Molisch[1]) in die Mikrochemie ein. Er brachte die Schnitte in eine völlig gesättigte Lösung von Kaliumhydroxyd. Nach kurzer Zeit schießen aus den Öltropfen Kristalle von Eugenolkalium an. Doch ist zu bemerken, daß eine möglichst konzentrierte Kalilauge angewandt werden muß. Je schwächer die Lauge, um so langsamer vollzieht sich die Kristallisation. Bisweilen entstehen die Kristalle erst nach längerer Zeit, selbst erst nach mehreren Stunden. Es sind kurze derbe Säulen und Nadeln, die überwiegend einzeln liegen. Bei Benutzung einer völlig gesättigten Lauge schießen aus frei liegenden Öltropfen sehr lange, zarte, bisweilen schwach gebogene Nadeln hervor, während die Tropfen dunkle und schaumige Beschaffenheit annehmen. Etwaige Kaliausscheidungen lassen sich durch Zusatz von Wasser und Erwärmen entfernen, Eugenolkalium bleibt hierbei ungelöst. Besonders ölreiche Präparate von Caryophyllus geben nach einiger Zeit Kristallgarben und Büschel, die bisweilen schwach gelbliche Färbung annehmen (Fig. 65b). Die Reaktion gelingt nicht nur mit Nelken und Piment (Handelsdroge), sondern selbst mit der Rinde von Sassafras officinale, dessen Öl nur wenig Eugenol enthält (Fig. 65a).

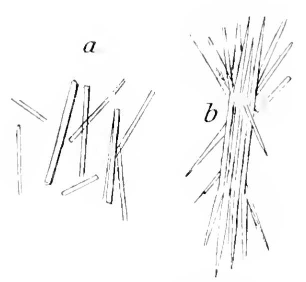


Fig. 65. Eugenolkalium, *a*) aus Sassafras officinale (Rinde), *b*) aus Eugenia caryophyllata (Droge) (Tunmann).

Die anderen Reaktionen sind für Eugenol nicht beweisend. Eugenol gibt eine blaue Eisenreaktion. Eugenolhaltige Präparate werden, vornehmlich nach dem Anfeuchten mit Alkohol, von Eisenchlorid tiefblau. Bei den Nelken und beim Piment färben sich nicht nur die Sekretzellen und ihr Inhalt, sondern das ganze Gewebe (nebst der Membran). Es ist hierbei zu beachten, daß sowohl die Nelken (Rosenthaler)[2]) als auch Piment (Tunmann)[3]) einen eisenbläuenden Gerbstoff führen, der gleichzeitig in Reaktion tritt. Eugenol (also auch die eugenolführenden Ölzellen) wird ferner mit Schwefelsäure langsam blutrot, schließlich violett, dann braun, mit Salpetersäure feurig-orange bis braunrot. Beide Reaktionen besagen wenig, denn eine Anzahl öliger Sekrete geben ähnliche Farbenreaktionen; auch mit Phloroglucinsalzsäure erhält man eine Färbung.

---

[1]) H. Molisch, Grundriß einer Histochemie d. pflanzl. Genußmittel, Jena 1891, S. 40, 44.

[2]) L. Rosenthaler, Pharm. Centralh., 1908, XLIX, S. 647.

[3]) O. Tunmann, Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 29.

Kampfer.

Kampfer, Laurineenkampfer kommt im Sekret der Ölzellen von Cinnamomum camphora vor. Das Sekret der Blätter und Zweige ist zähflüssig. Im Sekret älterer Axen scheidet sich der Kampfer auch kristallinisch ab. Die Dämpfe des Kampfers durchdringen leicht die verkorkten Wände der Sekretzellen und häufen sich in Spalten und Rissen der Räume sekundär an (bis 3 $^0/_0$), wobei sich wieder kristallinische Massen ausscheiden. Während synthetischer Kampfer sich mit Vanillinsalzsäure (P. Bohrisch, Pharm. Centralh., 1907, XLVIII, S. 527 u. 777), übrigens auch mit starker Salzsäure allein (W. Lenz, Arch. d. Pharm., 1911, CCXLIX, S. 286), nicht verändert, wird der natürliche Kampfer (Handelsware) rötlich, beim Erhitzen blaugrün. Der, diese Reaktionen bedingende Körper muß aus anderen Teilen des Kampferbaumes stammen, denn die kristallinischen Kampfermassen im Gewebe geben keine Reaktion, wohl aber die Inhalte des Leitparenchyms (Markstrahlen, Rindenparenchym). Diese reagieren außerdem mit Jodreagentien. Das Sekret der jüngeren Triebe wird mit Chlorzinkjod tiefgelb, dann rotbraun, schließlich schwarz, mit Jodjodkalium oder mit Eisenchlorid schwach gelb. Vanillinsalzsäure ruft keine Farbenreaktion hervor. Es gelingt nicht aus dem Sekret jüngerer Triebe (frisches und getrocknetes Material) den Kampfer kristallinisch zur Abscheidung zu bringen. Der Nachweis muß sich derzeit auf den Geruch beschränken; sind doch noch 0,005 μg Kampfer in 1 Liter Luft durch den Geruch wahrnehmbar. Einige Schnitte von Blättern, die mehrere Jahre in Papier aufbewahrt waren, gaben mit Wasser befeuchtet bei der Sublimation auf der Asbestplatte mehrere unscheinbare Sublimate mit sehr kräftigem Kampfergeruch[1].

Curcumin.

Curcumin, der für Curcumaarten typische Farbstoff, bildet in reinem Zustande rotgelbe Prismen, die in Alkohol und Äther leicht löslich sind. Die Lösungen zeigen grünliche Fluoreszenz. Der Farbstoff ist nur im ätherischen Öl, dem Sekret der Sekretzellen lokalisiert, hauptsächlich im Rhizom (Curcuma longa, viridifolia, amata), kommt nach Herrmann[2]) ebenfalls im Sekret der vegetativen Teile, allerdings in geringerer Menge, vor. In den lebenden Pflanzen ist das Sekret

[1]) O. Tunmann, Über die Ursache der Vanillinsalzsäurereaktion des Kampfers, Schw. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1909, XLVII, Nr. 34.

[2]) O. Herrmann, Nachweis organischer Verbindungen in vegetabilischen Geweben, Dissertation, Leipzig, 1876, S. 24, und A. Rosoll, Mikroch. Nachweis des Curcumins und Coniins in den vegetabilischen Geweben, 29. Jahresber. d. niederöst. Landes-Oberrealschule, Wien.-Neustadt, 1894, S. 1.

farblos bis gelb. Bei den, mit kochendem Wasser abgebrühten Rhizomen, bei der Curcumadroge, ist das Curcumin zum großen Teile in das Parenchym übergetreten und imprägniert hierbei auch die Zellwände.

Zum Nachweis benutzt man (Herrmann) bei lebenden Objekten essigsaures Blei (ziegelroter Niederschlag), konzentrierte Schwefelsäure (orangerote), verdünnte Schwefelsäure (1 + 1 Wasser, karminrote), Ammoniak, Kalilauge (rotorange Färbungen). Alkohol-Schwefelsäure (1 Alkohol + 3 Schwefelsäure) färbt ebenfalls rot (Linde)[1], die Curcuminreaktionen kommen auch den Curcumadrogen zu.

Borsäure färbt erst nach dem Eintrocknen rotbraun und wurde zum Nachweis von Curcuma in Rheumpulver herangezogen[2]. Das Pulver wird mit Borsäurelösung (1 : 30), die mit etwas Salzsäure angesäuert ist, angerührt und zur Trockne gebracht, der Rückstand wird zerrieben und in Paraffin untersucht (Rheum gelb, Curcuma rotbraun). Da die Farben nicht immer gut zu unterscheiden sind, so halte ich es für vorteilhafter den zerriebenen Rückstand zu verteilen, vorsichtig Natronlauge zuzusetzen (ohne Deckglas!) und die Einwirkung mikroskopisch zu verfolgen. Jedes Curcumapartikelchen wird tief blaugrün, jedes Rheumfragment karmoisinrot. Die blaue Färbung verblaßt bald, die Curcumateile erscheinen mehr oder weniger hell, die Anthrachinonfärbung geht in Rot über und verteilt sich schließlich über das ganze Präparat.

Menthol.

Menthol (Hexahydrothymol) gelangt in den Epidermaldrüsen von Mentha piperita bei Wasserentzug (Trocknen der Pflanzen, in alten Glyzerinpräparaten) in Kristallbüscheln im subkutikularen Raum zur Abscheidung (Fig. 66). Die Kristalle wurden von Tschirch (Flückiger-Tschirch, Grundl. d. Pharmakogn., 1884, S. 185) für Menthol angesprochen. Sie lösen sich leicht in Alkohol, Alkohol-Äther, Chloroform und Eisessig. Diese Lösungsverhältnisse besagen aber wenig. Der Beweis für die Mentholnatur der Kristalle wird erst durch die vorliegenden Nachprüfungen erbracht. Wir können nämlich die Kristalle im Öle der lebenden Pflanzen hervorrufen, wenn wir die Blätter oder Schnitte auf 10—15 Minuten unter 0° aufbewahren (künstliche Kältemischung, gleiche Teile von Ammoniumnitrat und Wasser). Bei vorsichtigem trocknen Erwärmen

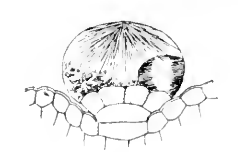


Fig. 66. Drüse von Mentha piperita mit Mentholkristallen (Tunmann).

[1]) O. Linde, Apoth.-Ztg., 1905, XX, Nr. 47.

[2]) E. Richter, Mikroskopischer Nachweis der Verfälschung von Rhabarberpulver mit Curcumapulver, Apoth.-Ztg., 1911, XXVI, S. 921.

der Präparate lassen sie sich ohne Rückstand verflüchtigen. Die Mentholkristalle gelangen, wie es scheint, niemals an sekundäre Lagerstätten, sind wenigstens der Epidermis frei aufliegend noch nicht beobachtet worden.

Methysticin.

In der Wurzel von Piper methysticum Forster wurde 1888 von C. Pomeranz[1]) ein stickstofffreier, in gelben Nadeln kristallisierender Körper gefunden, das Methysticin (Kawahin).

Methysticin ist nur im Inhalte der Ölzellen lokalisiert und läßt sich bereits mit 0,003 g Substanz (Pulver oder Schnitte der Wurzel) mikrochemisch in kristallinischer Form zur Anschauung bringen, indem man ein Präparat in absoluten Alkohol einlegt. Schon nach teilweiser Verdunstung des Alkohols scheiden sich am Deckglasrande zahlreiche prismatische Nadeln aus (120—160 μ lang, 15 μ sichtbare Breitenfläche), die bei gewöhnlicher Belichtung gelb sind, in rotviolett bis gelb polarisieren und sich in Schwefelsäure mit violetter Farbe lösen (Fig. 67a). Wird ein Präparat mit Kalilauge gekocht und nach teilweiser Verdunstung der Flüssigkeit verdünnter Alkohol (Alkohol und Wasser zu gleichen Teilen) zugefügt, so schießen aus den dunkelbraunen Harzballen gebogene, bis 1 mm lange, ungemein zarte Nadeln hervor, die braunrot polarisieren, sich in Essigäther lösen und die Kaliverbindung der Methysticinsäure darstellen (Fig. 67b). Im grüngelben homogenen Mikrosublimat ist ebenfalls Methysticin zugegen, welches mit Schwefelsäure, Salzsäure, Salpetersäure eine Reihe rötlicher Farbenreaktionen gibt. Außerdem erhält man in der Lösung des Mikrosublimates in alkoholischer Kalilauge bei Zusatz von Salzsäure eine zitronengelbe Fällung, Methysticinhydrat (Tunmann[2]).

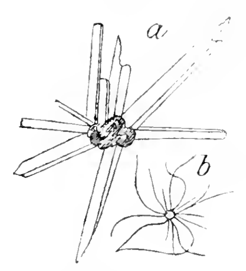


Fig. 67. *a)* Methysticinkristalle aus Piper methysticum (Wurzel, Schnitte) mit Alkohol erhalten; *b)* Methystieinsäure mit Kalilauge-Alkohol (Tunmann).

Santonin.

Santonin, Anhydrid der einbasischen Santoninsäure, findet sich zu 2—3% in den ungeöffneten Blütenköpfchen von Artemisia cina Berg und bildet farblose, bitterschmeckende, rhombische Täfelchen, die sich unter Deckglas leicht in Chloroform und Alkohol, langsam in Äther und nicht in Wasser lösen.

---

[1]) Chemische Literatur bei E. Winzheimer, Beiträge zur Kenntnis der Kawawurzel, Arch. d. Pharm., 1908, CCXLVI, S. 338.

[2]) O. Tunmann, Beiträge zur Mikrochemie einiger Wurzeldrogen, Kawa-Kawa, Gehes Berichte 1912, S. 179.

„Wenn man die Blütenköpfe der Droge mit Wasser durchfeuchtet und mit der Nadel auseinanderlegt, so findet man kleine Kristallsplitter, welche nach ihrem Verhalten zu Lösungsmitteln als Santonin betrachtet werden dürfen“ (Flückiger)[1]. Nach A. Meyer[2] kommen diese Kristalle „vorzüglich in den Drüsen oder neben denselben vor“ und lösen sich in Alkohol, Äther und Natronlauge. Tschirch[3] sagt, „daß das Santonin nur in den Öldrüsen entsteht“ und daß die Kristalle sich mit alkoholischer Natronlauge rot färben „unter gleichzeitiger Bildung von Santoninnatriumnadeln“. Die besten Kristalle sieht man den Flügeln der Hüllkelchblätter aufliegen: sie werden bis 60 μ lang; die typischen rhombischen Täfelchen sind meist 40 μ lang und 15 μ breit (Fig. 68 a); sie leuchten bei gekreuzten Nicols nur grau auf. In Sodalösung lösen sie sich erst beim Erwärmen und farblos auf. Die in der Chemie eingeführten Reaktionen (Diphenylaminschwefelsäure [rotbraun], basisch Wismutnitrat - Schwefelsäure [blau], Erhitzen mit Schwefelsäure [blau])[4] gaben mir kein Resultat, da die sofort entstehenden Mischfarben das Bild undeutlich machen. Doch auch die mikroskopisch empfohlene alkoholische Natronlauge ist weder zum Nachweis der Kristalle noch zum Santoninnachweis im Gewebe geeignet. Die Rotfärbung, die Santonin mit diesem Reagens gibt, ist bei Mengen unter 0,001 g unter dem Mikroskop nicht zu erkennen[5] und erfolgt bei größeren Quantitäten erst beim Erhitzen. Die bei Benutzung von Schnitten mit alkoholischer Natronlauge ausfallenden Kristalle sind zum Teil fremde Körper oder stammen zum Teil aus dem Reagens (Sphärite). Reines santoninsaures Natrium kristallisiert aus Alkohol in flachen Täfelchen, die man in den Präparaten nicht oder doch nur selten und dann in Zerrformen bemerkt. Die mit der Lauge eintretende Färbung (gelborange bis rötlich), die vorzüglich in den Sezernierungszellen der Drüsen

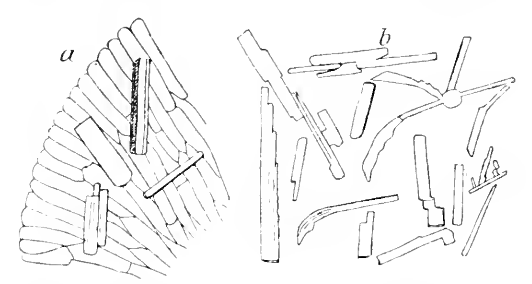


Fig. 68. Artemisia cina (Droge). Santoninkristalle, *a*) einem Hüllkelchblatt aufgelagert, *b*) in einem 14 Tage alten Sublimat (Tunmann).

[1] F. A. Flückiger, Pharmakognosie, 1881, S. 780.
[2] A. Meyer, Wiss. Drogenkunde, 1892, S. 312.
[3] Anatom. Atlas, 1900, S. 316.
[4] C. Reichard, Neue Reaktionen des Santonins, Pharm. Ztg., 1907, LII, S. 88.
[5] Ein Blütenköpfchen dürfte höchstens 0,02—0,03 mg Santonin enthalten.

und im Leitparenchym erfolgt, ist ebenfalls nicht eindeutig, denn ein Muster, das aus Köpfchen mit teilweise geöffneten Blüten bestand (vón dem es noch fraglich bleibt, ob überhaupt Köpfchen der echten Artemisia cina vorlagen) und welches nach dem makrochemischen Befunde von Prof. Heyl-Darmstadt keine Spur von Santonin enthielt, gab mit alkoholischer Natronlauge ebenfalls eine tief orangegelbe Färbung. Diese Köpfchen enthielten nicht die typischen Santoninkristalle. Die Sublimation ist beim Santoninnachweis infolge der trägen Kristallisation des Santonins recht umständlich. Drei zerdrückte Blütenköpfchen lieferten unscheinbare Sublimate: aus den Tröpfchen schieden sich nur selten und relativ wenige Kristalle aus. Bleiben die Sublimate 14 Tage der Ruhe überlassen, dann hat sich ein dichter Rasen gebildet, an dessen Peripherie schöne bis 70 μ lange, Santoninkristalle hervorragen (Fig. 68b). Es sind übereinander gelagerte Täfelchen und Balken. Vielfach sind die Kristalle nur an einem Ende gut entwickelt. Die Kristallisation durch Chloroform zu beschleunigen hat wenig Erfolg. Die Sublimate können mit den in der Chemie üblichen Schwefelsäurereagentien (s. oben) identifiziert werden. Typisch wirkt Chlorzinkjod auf Santonin ein. Die Kristalle werden langsam gelb, erhalten Risse und gehen schließlich in tief gelbbraune Tröpfchen über. Die Reaktion erfolgt sehr langsam (20 Minuten) und läßt sich bequem unter dem Mikroskop verfolgen; da sie in gleicher Weise bei den Kristallen der Blütenköpfchen eintritt, so sind diese, aber nur diese, Santoninkristalle, mit denen sie auch kristallographisch übereinstimmen.

Kautschuk.

Kautschuk ist ein Bestandteil des Milchsaftes der Pflanzen. Reich an Kautschuk sind Artocarpeen, Apocyneen, Euphorbiaceen, Campanulaceen, Compositen, Moraceen u. a. Die Pflanzen unserer Zone führen nur geringe Mengen. Der aus Pflanzen gewonnene Rohkautschuk besteht aus dem Reinkautschuk (einem Kohlenwasserstoff mit ringförmiger Anordnung, nach Harries ein 1,5 Dimethylcyklooktadien) und anderen Anteilen des Milchsaftes (Eiweiß, Fett, Farbstoff, Harzen, anorganischen Salzen).

Im frischen Milchsafte der Pflanzen tritt der Kautschuk in Form kleiner, farbloser bis gelblicher Tröpfchen auf, in getrockneten Pflanzen auch in kleinen Körnchen, die von verdünnten Säuren und Ätzalkalien nicht angegriffen werden. Die Mikrochemie ist noch recht lückenhaft, es erscheint noch fraglich, ob die als Kautschuk angesprochenen Bildungen verschiedener Pflanzen untereinander identisch sind. Dann muß auch hier, wie bei so vielen anderen Körpern (S. 222, unt.), betont werden, daß der Kautschuk des ausgeflossenen Milchsaftes und des

technisch gewonnenen Produktes nicht mit jenen im mikroskopischen Bilde als Kautschuk gedeuteten Kohlenwasserstoff-Gebilden übereinstimmen kann. Die Unterschiede werden in den Reaktionen zum Ausdruck kommen. Folgender Gang wäre vorzuschlagen. Die Schnitte werden (wenn möglich frisches oder in geeigneter Weise fixiertes Material) gewässert und dann 5—6 Tage mit 50% und ebenso lange mit absolutem Alkohol mazeriert. Gummi, Schleime, Harze, ätherische Öle, Fette werden zum größten Teile gelöst sein (Äther läßt sich nicht allgemein zur Entfettung benutzen, Alkaloide können durch Weinsäure-Alkohol entfernt werden). Jedenfalls besteht der Milchröhren-Inhalt nun der Hauptsache nach aus Plasma-Eiweiß und Kautschuk. Letzterer muß sich in Chloroform lösen, Alkannin (S. 235), Carmin, Anilinfarbstoffe[1]) u. a. speichern, von verdünnten Säuren und Alkalien (Unterscheidung von Fetten) nicht angegriffen werden und sich durch Wärme entfernen lassen. Zum Nachweis des beim Erwärmen zurückbleibenden Eiweiß werden Jodreagentien genügen (s. Eiweiß). Die Lösungsverhältnisse der Kautschuktröpfchen werden nicht immer übereinstimmen. Azeton sowie Trichloressigsäure (auch verdünnte) bewirken Koagulation, ebenso andere Eiweißfällungsmittel (s. Eiweiß). Bei Gegenwart reichlicher Kautschukmengen wäre die Sublimation zu versuchen.

Im polarisiertem Lichte zeigen die Kautschukkörnchen ein verschiedenes Verhalten. Hevea- und Castilloa-Kautschuk brechen das Licht nicht. Der Kautschuk von Parameria und der Hippocrateaceen zeigt nach Fritsch[2]) lebhafte Doppelbrechung, die durch heiße Kalilauge oder Kochen mit Wasser vorübergehend aufgehoben wird. Hippocrateaceen-Kautschuk wird von Alkohol oder Äther nicht verändert, von Schwefelsäure und Osmiumsäure geschwärzt, von Chloroform und Benzol bis auf geringe Reste gelöst und kann durch Erwärmen auf dem Objektträger verflüchtigt werden. Körnchen von den gleichen Reaktionen kann man aber nach Fritsch auch allenthalben in den Palisaden und den Zellen der Epidermis antreffen. Die Kautschuktröpfchen von Ficus lösen sich in Äther, Benzol, Schwefelkohlenstoff, quellen in Chloralhydrat, färben sich mit Alkanna, verflüchtigen sich beim Erwärmen, sind aber unlöslich in Wasser, Glyzerin, verdünnten Säuren und Alkalien. — Die Guttaperchasubstanz der Sapotaceen löst

[1]) A. Vogl, Beitr. z. Anat. u. Histologie von Convolvulus arvensis, Verh. Wiener. zool.-bot. Ges., 1863, XIII, S. 257 und: Beitr. z. Kenntn. d. Milchsaftorgane der Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1866, V, S. 3.

[2]) F. E. Fritsch, Untersuchungen über das Vorkommen von Kautschuk bei den Hippocrateaceen, verbunden mit einer anat. system. Unters. von Blatt und Achse bei derselben Familie, Bot. Centralbl., Beih., 1901, XI, S. 283.

sich leicht in Xylol[1]). Verfügt man über lebendes Material, dann ist die Analyse eines frisch ausgetretenen Tropfens des Milchsaftes anzuraten.

Über die Bildung des Kautschuks liegen wenige Untersuchungen vor. In den Früchten von Struthanthus und Phthirusa (Loranthaceen) entsteht er nach Iltis[2]) im Inhalte der Parenchymzellen, die auch in der reifen Frucht Zellkern und Plasmaschlauch aufweisen. Die Wandungen dieser, in jungen Früchten Milchsaft führenden Kautschukzellen beteiligen sich nicht an der Bildung.

Beim Studium über Verteilung der Milchröhren bedarf es häufig größerer Präparate, die naturgemäß dicker sind. Um in solchen die Milchröhren gut sichtbar zu machen, wird man die verschiedenen Bestandteile des Milchsaftes, vorzüglich den Kautschuk, benutzen. Die Schnitte werden bis mehrere Tage mit (eventuell verdünntem) Eau de Javelle behandelt, amylumreiche Objekte werden mit verdünntem Chloralhydrat mazeriert, vertragen meist auch ein Erwärmen. Stets bleibt genügend Milchsaft zurück, der bei nachfolgender Alkanninfärbung ein Auffinden der Milchröhren gestattet. In anderen Fällen können die übrigen Inhalte zur Sichtbarmachung dienen (s. Ferulasäure, S. 217). Die Milchröhren der Lactarius- und Russula-Arten weisen Arnould und Goris[3]) mit Vanillinschwefelsäure nach (blaue bis rötliche Färbung: Vanillin 0,25 g, Wasser und Schwefelsäure je 2 Vol.). Die Ursache der Reaktion wird nicht angegeben. Vielleicht beteiligen sich Indol und Skatol hierbei.

Gerbstoffe.

Als Gerbstoffe fassen wir stickstofffreie, wasser- oder alkohollösliche, überwiegend amorphe Körper zusammen, die adstringierenden Geschmack besitzen, meist tierische Haut gerben, eine Anzahl Reaktionen gemeinsam haben (Leim- und Alkaloidlösungen fällen) und bei enzymatischen Prozessen (Oxydation) amorphe, schwer lösliche Phlobaphene liefern. In den lebenden Zellen werden jedenfalls viele Gerbstoffe in glykosidischer Bindung auftreten[4]). Sie kommen im ganzen Pflanzenreiche und in allen Teilen der Pflanzen vor. Durch hohen Gehalt an

---

[1]) A. Charlier, Contributions à l'étude anatomique des plantes à gutta-percha et d'autres Sapotacées, Journ. de Bot, 1905, XIX, S. 127.

[2]) H. Iltis, Über das Vorkommen und die Entstehung des Kautschuk bei den Kautschukmisteln, Anz. Wien. Akad., 1911, X, S. 181.

[3]) L. Arnould et A. Goris, Sur une réaction colorée chez les Lactaires et les Russules, Compt. rend., 1907, CXLV, S. 1199.

[4]) Nach K. Feist, E. Fischer und K. Freudenberg ist Tannin eine Penta-digalloyl-Glykose (Ber. chem. Ges., 1912, XLV, S. 915 u. 1493).

Gerbstoff zeichnen sich die Gallen (pathologische Gerbstoffe) aus (Aleppo-Gallen 58, chinesische 60—75, deutsche 14—17 %), ferner die Rinde der Bäume und Wurzeln (physiologische Gerbstoffe, Betula 2, Fraxinus 3, Larix 10, Alnus 20 %), verschiedene Hölzer (Juglans 5, Quebracho colorado 20—30 %), Samen und Früchte (Punica granatum, Fruchtschale 28, Areca catechu, Samen 18 %, Caesalpinia-Arten, Hülsen 30—60 %), Laubblätter (Thea, Rhus-Arten). Lichtblätter sind gehaltreicher als Schattenblätter.

In der lebenden Zelle ist der Gerbstoff teils im Zellsaft gelöst, teils in besonderen Safträumen, in Vakuolen des Plasma als Gerbstoffbläschen lokalisiert. Letztere sind stark lichtbrechend, sollen mit einer Membran von gerbsaurem Eiweiß umschlossen sein und treten bei Algen gewöhnlich als zahlreiche kleine Gebilde auf, während sie in den Zellen der höheren Pflanzen ganz bedeutende Größe erreichen können. Beim Absterben der Zellen werden die Gerbstoffe zum Teil von den Membranen aufgespeichert; in getrockneten Pflanzen bilden sie mit dem Protoplasten formlose Klumpen. In Alkoholmaterial fallen Gerbstoffzellen oft durch ihre gelbbraune Färbung auf. Nach Arnhold[1]) stehen Gerbstoffe zur Atmung in Beziehung, wobei sie in Fett und in eine aromatische Verbindung übergeführt werden. Hierfür sprechen die Atmungsquotienten. Stahl[2]) faßt sie mit Recht als ein Schutzmittel gegen Tierfraß, Kraus[3]) auch gegen Fäulnis, auf. Nach Warming verringern sie ein Austrocknen der Rinde. Der Zucker der glykosidischen Gerbstoffe kann gelegentlich als Nahrstoff in Betracht kommen[4]). Bei Spirogyren beteiligt sich der Gerbstoff an der Bildung der Zellwand (van Wisselingh, l. c.). Doch ist er sicher kein echter Reservestoff. Albo[5]) hat ihn als Nahrstoff hingestellt und mit der Stärkebildung in Verbindung gebracht. Meist werden die Gerbstoffe Endprodukte des Stoffwechsels sein.

Beim mikrochemischen Nachweis der Gerbstoffe stehen die Reaktionen mit Eisenverbindungen an erster Stelle. Am meisten wird auch heute noch Eisenchlorid benutzt. Man hält die offizinelle Lösung vorrätig und verdünnt diese bei Bedarf mit etwa 10 Teilen destilliertem Wasser. Verdünnte Eisenchloridlösungen zersetzen sich bei längerer Aufbewahrung. Zu beachten ist jedoch, daß Eisenchlorid mit vielen aromatischen Verbindungen reagiert, welche eine oder mehrere Hydroxylgruppen besitzen. Viele gerbsaure Eisenverbindungen werden von verdünnten Säuren gelöst. Selbst die verdünnte Eisenchloridlösung löst die Niederschläge, besonders von eisengrünenden Gerbstoffen, leicht auf. Möller suchte diesem Nachteil abzuhelfen, indem er eine Lösung von wasserfreiem Eisenchlorid in wasserfreiem Äther als Re-

[1]) W. Arnhold, Über das Verhalten des Gerbstoffes bei Gunnera, Kieler Dissertation, 1911.

[2]) E. Stahl, Pflanzen und Schnecken, Jena 1888.

[3]) G. Kraus, Grundlinien zu einer Physiologie des Gerbstoffes, Leipzig 1889.

[4]) W. Pfeffer (s. auch Lebendfärbung).

[5]) G. Albo, L'azione del tannino sulla germinazione e sullo sviluppo del Solanum tuberosum, N. Giorn. bot. ital., 1904, XI, S. 521.

agens benutzte[1]). Mit dieser Lösung prüfte er größere Blattstücke. Die Lösung ist nur einmal zu benutzen. Eine gute Reaktion gibt Liquor ferri acetici, doch diffundiert die Lösung sehr langsam. Handelt es sich daher um den Nachweis in größeren Gewebestücken, so leistet die schneller eindringende, offizinelle Tinctura ferri acetici bessere Dienste. Wässerige Ferrosulfatlösung (1,0 g Ferrum sulfuricum alcohol. praec., 20,0 g Wasser), die bereits die älteren Autoren (Trécul, Karsten) benutzten und die schon von Link[2]) empfohlen wurde, ist sehr außer Gebrauch gekommen, da sich die Lösung selbst bei Lichtschutz nicht gut hält; sie liefert aber brauchbare Reaktionen und zuweilen bessere als andere Eisenreagentien. Loew und Bokorny[3]) bedienten sich einer konzentrierten wässerigen Lösung von Eisensulfat zum Gerbstoffnachweis in Algen. Die Algen verblieben 12—24 Stunden in der Eisensulfatlösung. Schwaches Erwärmen (auf 60^0) soll die Reaktion beschleunigen. Büttner[4]) hält die Eisenverbindungen für die besten mikrochemischen Reagentien auf Gerbstoffe und gebraucht von den verschiedenen Eisensalzen 0,02—0,2 % Lösungen in ganz schwach saurem Zustande, u. a. auch Ferrum citricum ammoniatum (Ferrum citricum oxydatum wird mit Ammoniak bis zur schwach sauren Reaktion abgestumpft).

Die Eisenreagentien geben teils blaue bis blauschwarze, teils grünliche Reaktionen; es ist bekannt, daß man früher die Gerbstoffe in eisenbläuende und eisengrünende einteilte. Aus dem Eintreten einer blauen oder grünen Reaktion läßt sich in mikrochemischer Hinsicht kein Urteil fällen, da gleichzeitig anwesende Pflanzensäuren (Zitronensäure) die Färbung modifizieren können (Blau in Grün überführen).

Kaliumdichromat, zuerst von Sanio[5]) empfohlen, wird vielfach benutzt. Es ist jedoch ebenfalls kein spezifisches Reagens auf Gerbstoff, denn es gibt braune Niederschläge mit Brenzcatechin, Hydrochinon, Pyrogallol, heißen α-Naphthollösungen, Gallussäuren, reagiert mit Alkaloiden u. a. Man legt die Präparate (vorteilhaft von lebenden Pflanzen) auf dem Objektträger direkt in wässerige Kaliumdichromatlösung (1 : 10). In gerbstoffhaltigen Zellen entsteht ein dichter grau- oder rotbrauner, flockiger oder körniger Niederschlag, der sich oft

[1]) H. Möller, Anatomische Untersuchungen über das Vorkommen der Gerbsäure, Ber. d. bot. Ges., 1888, VI, S. 66.

[2]) Link, Grundlehren der Anatomie, 1807, S. 80.

[3]) O. Loew und Th. Bokorny, Über das Verhalten der Pflanzenzellen zu stark verdünnter alkalischer Silberlösung, Botan. Centralbl., 1889, XXXIX, S. 370.

[4]) R. Büttner, Über Gerbsäure-Reaktionen in der lebenden Pflanzenwelt, Dissertation Erlangen 1890.

[5]) C. Sanio, Vergl. Unters. über die Zusammensetzung des Holzkörpers, Botan. Ztg., 1863, XXI, S. 17.

zusammenballt. Die Fällung ist unlöslich in Glyzerin, Wasser und Alkohol, und wird weder durch schweflige Säure noch durch Wasserstoffsuperoxyd verändert (Overton)[1]. Die rotbraune Färbung entsteht zuweilen erst nach einiger Zeit. Aus den Farben der Fällungen lassen sich annähernde Schlüsse auf die Menge des anwesenden Gerbstoffes ziehen. Ein flockig-körniger Niederschlag rührt von gelöstem Gerbstoff her: die Gerbstoff-Kugel oder -Vakuolen pflegen sich homogen braun zu färben. Eine homogene, mehr oder weniger dunkelgelbbraune Färbung (und kein Niederschlag) entsteht auch, wenn Oxalsäure oder saure oxalsaure Salze zugegen sind[2]. Ferner können Apfel-, Wein-, Zitronensäure u. a. den Niederschlag verhindern. Möller hält den Niederschlag für ein Oxydationsprodukt und zwar für Purpurogallin. Wahrscheinlich gibt es mehrere Purpurogalline, da sich die Niederschläge gegen Alkalien und Säuren verschieden verhalten, teils in Alkalien und in Säuren leicht löslich, teils in konzentrierten Säuren unlöslich sind.

Viel angewandt wird die Mazeration. Man legt größere Pflanzenstücke auf mehrere Tage in eine konzentrierte Kaliumdichromatlösung ein, wäscht die Pflanzenteile in fließendem Wasser gut aus und fertigt aus ihnen erst die Schnitte an. Die Schnitte lassen sich zur Herstellung von Dauerpräparaten verwenden, da die Niederschläge sich in Glyzeringelatine halten. Zum Einlegen in Kanadabalsam müssen die Präparate zuvor durch Alkohol entwässert und mit Nelkenöl aufgehellt werden. Um ein schnelles Eindringen der Chromatlösung zu bewirken, empfahl af Klercker[3]) die Objekte (Algen in toto, von höheren Pflanzen die Schnitte) auf einige Augenblicke in eine kochende Kaliumdichromatlösung zu tauchen, während Möller (a. a. O.) das geringe Diffusionsvermögen durch Zusatz einiger Tropfen Essigsäure erhöht und Berthold[4]) das Material in eine konzentrierte Kaliumdichromatlösung untertaucht, die $^{1}/_{2}$—1 Stunde unter der Glocke der Wasserluftpumpe belassen wird. Die Stücke werden nach dem Auswaschen sofort untersucht oder in konzentriertem Glyzerin konserviert.

---

[1]) E. Overton, Beiträge zur Histologie und Physiologie der Characeen, Botan. Centralbl., 1890, XLIV, S. 5.

[2]) M. Küstenmacher, Beiträge zur Kenntnis der Gallenbildung mit Berücksichtigung des Gerbstoffes, Jahrb. f. wiss. Bot., 1894, XXVI, S. 82.

[3]) J. af Klercker, Studien über die Gerbstoffvakuolen. Dissertation Tübingen 1888. Abdruck aus Bihang till K. Svenska Vet.-Akad. Handlingar, Stockholm 1888, Afd. III, Nr. 8, Sep.

[4]) G. Berthold, Untersuchungen zur Physiologie der pflanzlichen Organ., 1. Teil, Leipzig 1898.

Chromsäure in verdünnten Lösungen (0,5—1,0%) wirkt ähnlich wie Kaliumdichromat, hat sich aber als Gerbstoffreagens nicht allgemein eingebürgert. Durch Kombination von Chromsäure mit Osmiumsäure (Flemmingsche Chromosmiumsäure, von J. af Klercker empfohlen) läßt sich mit der Fällung der Gerbstoffe gleichzeitig eine Fixierung des Plasmakörpers erzielen.

Das von Unverdorben und Franchimont 1871 zum mikrochemischen Harznachweis benutzte Kupferazetat (S. 233) führte Moll[1]) als Gerbstoffreagens ein. Größere Pflanzenstücke werden 1 bis 3 Wochen in einer konzentrierten wässerigen Lösung von kristallinischem Kupferazetat mazeriert. Die Pflanzenteile werden ausgewaschen. Die Präparate zeigen die Gerbstofffällungen als bräunliche Klumpen, die durch Zusatz von verdünnten Eisenreagentien (0,5% wässerige Eisenazetatlösung) blaue oder grüne Färbung annehmen. af Klercker empfahl eine alkoholische Kupferazetatlösung (kristallinisches Kupferazetat in absolutem Alkohol gelöst; die filtrierte Lösung muß vor Licht geschützt aufbewahrt werden), wodurch zugleich das Plasma gehärtet wird. Den gleichen Effekt erreicht man durch Aufkochen kleinerer Pflanzenstücke (1—2 cm große) in einer konzentrierten wässerigen Kupferazetatlösung. Die Nachbehandlung der Kupferfällungen mit Eisensalzen ist nach eigenen Beobachtungen unbedingt notwendig, da sonst Irrtümer durch mitgefällte Harze und Fette nicht ausgeschlossen sind.

Das Einlegen größerer Pflanzenteile in Lösungen von Kaliumdichromat oder von Kupferazetat wurde von Wagner[2]) in größerer Ausdehnung zum Nachweis des Gerbstoffes bei den Crassulaceen benutzt. Die von diesem Autor außerdem benutzte Mazeration mit Bleiazetat ist nicht zu empfehlen. Büsgen[3]) injizierte die Objekte mit Kaliumdichromat, ließ sie absterben und nahm sie nach sorgfältigem Auswaschen in Untersuchung.

Die reduzierenden Eigenschaften mancher Gerbsäuren werden bei der Osmiumsäurereaktion benutzt, die von Dufour[4]), Stadler[5]), Pick u. a. angewandt wurde. Osmiumsäure (1%) wird den unter Deckglas liegenden Präparaten zugesetzt und ruft dunkle bis schwarze

[1]) J. W. Moll, Eene nieuwe mikrochemische looizuurreactie, Maanblad voor Naturwetenschappen, 1884, Rec. trav. chim., 1885, III, S. 363.

[2]) Ed. Wagner, Über das Vorkommen und die Verteilung des Gerbstoffes bei den Crassulaceen, Dissert. Göttingen, 1887.

[3]) M. Büsgen, Beobachtungen über das Verhalten des Gerbstoffes in den Pflanzen, Jenaische Ztschr. für Naturwiss., 1889, Sep.

[4]) J. Dufour, Notices microchimiques sur le tissu épidermique des végétaux, Bull. de la Soc. vaud. d. Sc. nat. 1886, XXII, S. 134.

[5]) S. Stadler, Beiträge zur Kenntnis der Nectarien und Biologie der Blüten, Berlin 1888.

Färbungen und Fällungen hervor. Nun reagiert bekanntlich Osmiumsäure ebenfalls mit Harzen und Fetten. Im Mesophyll der Blätter sind überwiegend Gerbstoff und Fett zugleich enthalten. Man muß daher Vergleichspräparate zu Rate ziehen und aus einem Teil der Schnitte den Gerbstoff entfernen, indem man die Schnitte erst im Reagenzglase mit Wasser behandelt (schüttelt) und dann unter Deckglas mit 50—70 % Alkohol auswäscht (in dem die meisten Fette unlöslich sind). Gerbstofffreie und gerbstoffhaltige Schnitte werden nun unter einem Deckglase mit Osmiumsäure behandelt. Auf einfachere Weise läßt sich aber Gerbstoff von Fetten mit Hilfe von Eau de Javelle unterscheiden; in diesem Reagens zersetzen sich Gerbstoffe schnell, während Fette nicht angegriffen werden (Zimmermann, Lit. s. S. 92, 3). Durch Osmiumsäure hervorgerufene Blaufärbung deutet meist auf Gerbstoff. Die Blau-Färbung oder -Fällung tritt klarer hervor, wenn man die Präparate in einen Tropfen verdünnter Salzsäure einträgt und dann erst Osmiumsäure zusetzt (Dufour). Die mit Osmiumsäure gefärbten Gerbstoffe werden durch Wasserstoffsuperoxyd wieder entfärbt.

Gardiner[1]) führte Molybdänsäure als Gerbstoffreagens ein. Es wird eine konzentrierte Lösung von molybdänsaurem Ammon in konzentrierter Chlorammonlösung benutzt, welche in gerbstoffhaltigen Zellen gelbe Niederschläge hervorruft, mit Digallussäure (Tannin) aber einen roten Niederschlag gibt: der rote Niederschlag ist in Chlorammonium unlöslich, der gelbe löst sich darin. Möller (a. a. O.) hielt das molybdänsaure Ammon für das beste Reagens, zumal es in schwach alkalischer Lösung (durch Ammoniakzusatz) die Zellen schnell durchdringt. Braemer hingegen bezeichnet als Nachteile der Methode, daß die Niederschläge sich leicht in Wasser und verdünnten Säuren lösen und das Reagens selbst sehr wenig haltbar ist. Er empfiehlt daher Natriumwolframat mit Natriumazetat (1,0 g Natriumwolframat, 2,0 g Natriumazetat, 10 ccm Wasser)[2]). Das Reagens fällt in saurer oder in ammoniakalischer Lösung Gallussäure braun, Gallusgerbsäure gelb. Anwesenheit von Weinsäure oder Zitronensäure verhindert das Eintreten der Reaktion. Sonst ist die Reaktion recht empfindlich und zeigt noch 0,00001 g Gallusgerbsäure an.

---

[1]) W. Gardiner, The determination of Tannin in vegetable cells, The Pharm. Journ. and Transact., 1884, S. 588.

[2]) L. Braemer, Un nouveau réactiv histo-chim. des tannins, Bull. Soc. d'Hist. Nat. de Toulouse, 1889, Janv., Sep., sowie: Les tannoides, introduction critique à l'histoire phys. des tannins et des principes immédiats végétaux, qui leur sont chimiquement alliés, Toulouse 1891.

af Klercker hat Alkalikarbonate (Ammonium-, Kalium-, Natriumkarbonat, Chlorammonium, auch Ammoniak) als Gerbstoffreagentien benutzt. Von höheren Pflanzen werden die Präparate frischen Materials auf dem Objektträger in eine 1—5%ige wässerige Lösung eingelegt. Nach kurzer Zeit entstehen kleinkörnige Fällungen, die sich allmählich zusammenballen und eventuell anwesende Farbstoffe (Anthocyane) mitfällen. Niedere Pflanzen (Algen) können in sehr verdünnten Lösungen (0,02%) kultiviert werden. Sie zeigen dann die Gerbstofffällungen besonders deutlich bei Vergleichspräparaten. Die durch Alkalikarbonate bewirkten Fällungen lösen sich im Überschuß der Fällungsmittel und werden durch Kaliumdichromat homogen braun gefärbt. An lebendem Material können die Reaktionen zur Kontrolle dienen, bei Herbarmaterial und bei Drogen wird man praktischerweise ganz von ihnen absehen, da sie einmal keine Vorteile gegenüber den früher genannten Reagentien bieten und dann einerseits die oft anwesenden sauren Phosphate u. dergl. fällen, anderseits mit Gallussäure nicht reagieren.

Ein sehr brauchbares Reagens, das die Verteilung der Gerbstoffe innerhalb der lebenden Zellen zu beobachten gestattet, ist das von Pfeffer zur Lebendfärbung benutzte Methylenblau (eine filtrierte Lösung von 1,0 Methylenblau in 500000,0 Regenwasser, s. Lebendfärbung). Die Reaktion ist nicht bei Organen ausführbar, die durch eine Kutikula, Wachsschichten, Korkmembranen u. dergl. geschützt sind. Versuchsobjekte sind Algen (Zygnema), zarte Wurzeln und Wurzelhaare (Stratiotes, Wurzelhaube). Den zu untersuchenden Objekten werden in Bechergläsern während mehrerer Stunden große Quantitäten der Farbstofflösung (1 Liter) zur Speicherung zur Verfügung gestellt. Bewegen der Lösung beschleunigt die Farbstoffaufnahme. Die Lebenstätigkeit der Zellen wird hierbei nicht gestört. Gerbstoffkugeln werden homogen blau, mit Gerbstoff erfüllte größere Vakuolen zeigen zunächst einen schwach blau gefärbten Vakuolensaft. Die Färbung nimmt allmählich an Intensität zu, wird stärker als die der zugeführten Lösung und schließlich entsteht ein blauer Niederschlag von gerbsaurem Methylenblau (af Klercker). Ob es sich in allen Fällen um Gerbstoffe handelt, erscheint fraglich. Nach Waage[1]) speichert Phloroglucin ebenfalls Methylenblau. Auch die phloroglucidischen Gerbstoffe der Rinden unserer Bäume und Sträucher speichern (an eingestellten Zweigen beobachtet) Methylenblau. Die Mythylenblau-Färbung der Gerbstoffvakuolen verblaßt in Glyzeringelatine nach wenigen Wochen. Die

[1]) Th. Waage, Über das Vorkommen und die Rolle des Phloroglucins in der Pflanze, Ber. deutsch. bot. Ges., 1890, VIII, S. 250.

Färbung läßt sich nach Zimmermann[1]) in Dauerpräparaten in folgender Weise erhalten: Die gefärbten Objekte kommen auf 2 bis 24 Stunden in eine konzentrierte wässerige Pikrinsäurelösung, werden wiederholt in reinem Wasser umgeschwenkt, dann zunächst in 15 % Alkohol, allmählich in konzentrierteren Alkohol gebracht, darauf in ein Gemisch von 3 Teilen Xylol und 1 Teil Alkohol, dann in Xylol übertragen und schließlich in Kanadabalsam eingeschlossen. Bei der Übertragung in Kanadabalsam sind Nelkenöl, Phenol oder Anilin nicht zu verwenden, da sie die Färbung sofort auswaschen. Klercker[2]) fixiert einige Stunden mit Chromessigsäure (Flemming) oder 1 bis 2 Tage mit einem Gemisch von gleichen Teilen Pikrinschwefelsäure und konzentrierter Kupferazetatlösung, wäscht mit Wasser aus, schneidet in Paraffineinbettung und schließt in Kanadabalsam ein; im ersteren Falle (bei Fixierung mit Chromessigsäure) sind die Gerbstoffvakuolen braunrot, im letzteren Falle grünlich.

Schließlich sind Koffein und Antipyrin wiederholt benutzt worden. Hierbei wird die Lebenstätigkeit der Zellen nicht geschädigt. Von Overton[3]) wurden 0,25—0,50 % Koffeinlösungen oder 1 % Antipyrinlösungen bei Zellen mit rotem Zellsaft und bei Kryptogamen benutzt und von van Wisselingh[4]) 1 % Lösungen von Antipyrin und 0,1 % von Koffein bei Spirogyren. Die Algen können 10 Minuten ohne Schaden zu nehmen in den Reagentien verweilen. Die Einwirkung von Koffein wurde zuerst von Loew und Bokorny studiert (vergl. auch Lebendfällung).

Weitere Reagentien sind Titanlösung, Zinnsalz und Schwefelammonium. Makroskopisch geben diese Reagentien zweifelsohne brauchbare Resultate, für Schnitte sind sie nicht oder doch nur wenig geeignet[5]). Auch Kalilauge ruft in Gerbstoffzellen Färbungen hervor (gelb, rotbraun). Urannitrat, Thalliumkarbonat, Palladiumchlorür u. a. wurden in neuerer Zeit von Cavazza[6]) herangezogen.

---

[1]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik, Tübingen 1892, S. 228.

[2]) J. af Klercker, Über Dauerpräparate gerbstoffhaltiger Objekte, Verh. biolog. Ver. Stockholm, 1981, IV, Nr. 3.

[3]) E. Overton, Beobachtungen und Versuche über das Auftreten von rotem Zellsaft bei Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1899, XXXIII, S. 171.

[4]) C. van Wisselingh, Der Nachweis des Gerbstoffes in der lebenden Pflanze und seine physiologische Bedeutung, Verslag Verg. Kon. Ak. Wet. Amsterdam, 9 Maart 1910.

[5]) W. Eitner und Meerkatz, Untersch. des Kastanienextraktes vom Eichenholzextrakt, Just Jahrber., 1886, II, S. 287. — W. Eitner, Über einige Reaktionen der Gerbstoffe, Arch. f. Chem. u. Mikr., 1911, IV, S. 109.

[6]) L. E. Cavazza, Studi microchimici e fisiologici sui tannini, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 59.

Möglicherweise wird in speziellen Fällen eisenhaltige Schwefelsäure (das Digitalinreagens Kilianis)[1]) als Hilfsreagens brauchbar sein, mit dem Brissemoret[2]) makrochemisch bestimmte Farbenreaktionen erhalten hat. Das Reagens gab nachstehende Färbung: I. Gallussäuretannoide: Pyrogallol rosagrünlich, Ellagsäure, Psidi-, Granato-, Nucigerbsäure grüngelb, Nuphargerbs., Hamamelistannin rot, Kinogerbs. rosa, Geraniumgerbs., Tannin der chinesischen Galläpfel gelb. II. Kaffeesäuretannoide: Brenzcatechin violett-blaugrün, Protocatechugerbs. keine Färbung, Kaffeesäure (Chlorogensäure?) scharlachfarben. III. Phloroglucintannoide: Phloroglucin gelb, Quebracho-, Eichengerbs. dunkelrot, Filix-, Sorbusgerbs. scharlachrot, Äsculingerbs. rotviolett, Tormentill-, Ratanhia-, Arecagerbs. und das Tannoid von Rhus triphyllum bordeauxrot, Cachou-, Guarana-, Cedrelagerbs., Catechin, Colatannin purpurn.

Mit Gerbstoff durchtränkte Eiweißkörper werden von Osmiumsäure gebräunt (Overton). Um Gerbstoff in den Aleuronkörnern nachzuweisen, entfettet man die Präparate zuvor mit Äther (s. Aleuron). Die Cystolithen der Urticaceen und Acanthaceen geben Gerbstoffreaktion (Eisenchlorid dunkelgrün, braun, rostrot, Molisch). — Eigenartige Gerbstoffkugeln und „Ligninköper" hat Hartwich in der Nahrungsschicht der Infektoriagallen aufgefunden und beschrieben und ist auf diese Bildungen nochmals 1905 eingegangen[3]). — Gerbstoffähnliche Tröpfchen hat Wallin[4]) in den Gefäßbündelscheiden der Bromeliaceenblätter beschrieben. Sie lösen sich in kochendem Wasser, Ammoniak, Essigsäure, Eau de Javelle, 40 % Alkohol, werden durch Osmiumsäure schwarz, durch Jodjodkalium rot, 4 % Ferriazetat tiefschwarz, durch Kupferazetat nach einigen Tagen kupferfarbig, durch Ammoniumdichromat homogen braun (im Gegensatz zu den Gerbstoffvakuolen, die hierbei körnig braun werden). Die schwach gelblichen Tropfen sollen einen oxyaromatischen Körper enthalten.

Flechtensäuren.

Als Flechtensäuren faßt man eine Anzahl Flechtenkörper zusammen, welche meist den Hyphen oder der Thallusoberfläche aufgelagert sind, vornehmlich den im Wachstum begriffenen Thalluslappen und den Bildungsstätten der Soredien. Sie haben Säurecharakter, sind überwiegend Benzolabkömmlinge und verleihen den Flechten vielfach ganz charakteristische Färbungen. Ihre biologische Bedeutung

[1]) Das Reagens besteht aus 100 ccm reiner Schwefelsäure + 1 ccm einer 5 % wässerigen Lösung von Ferrum sulfuricum purissimum; Kiliani, Über den Nachweis der Digitalisglykoside und ihrer Spaltungsprodukte, Arch. d. Pharm., 1896, CCXXXIV, S. 273.

[2]) A. Brissemoret, Über eine Farbenreaktion der Tannoide, Bull. Soc. chim. France, 1907, 4 ser. I, S. 474.

[3]) C. Hartwich, Ber. deutsch. bot. Ges., 1885, III, S. 146 u. Arch. d. Pharm., 1905, CCXLIII, S. 584.

[4]) G. S. Wallin, Über gerbstoffähnliche Tröpfchen im Zellsafte der Bromeliaceen-Blätter, Bot. Centralbl., 1898, LXXV, S. 323.

ist unbekannt. Eine zusammenfassende eingehende Darstellung haben sie von Zopf[1]) erfahren.

Mikrochemische Reaktionen hat schon E. Bachmann[2]) zur Bestimmung von Krustenflechten benutzt. Er untersuchte die schwarzen Apothecien, deren Pigment aus verschiedenen Farben zusammengesetzt ist, und benutzt Kalilauge, Ammoniak, Salpetersäure und Salzsäure. — Senft[3]) bedient sich der Fähigkeit der Flechtensäuren, aus heißem Öle (Knochenöl) in für die Diagnose charakteristischen Kristallen auszukristallisieren. Man zerreibt ein kleines Thallusstückchen (am besten des Randes) in einem Tropfen Öl und erhitzt über kleiner Flamme einige Zeit. Nach einem Tage tritt Kristallbildung ein. Ist die vorhandene Menge an Flechtensäuren nur gering, so ist es ratsam, zunächst den Flechten die Säuren durch Auskochen mit Chloroform, Alkohol oder Benzol zu entziehen. Der Auszug wird eingedunstet, der Rückstand in heißem Öl zur Kristallisation gebracht (Ölverfahren). Sowohl Derivate der Pulvinsäure als auch der Azetylessigsäure lassen sich mit heißem Öl nachweisen.

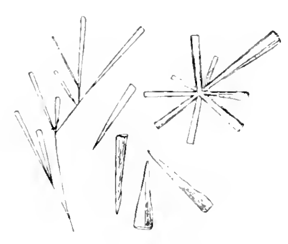


Fig. 69. Rhizocarpsäure aus Rhizocarpon geographicum mit dem Ölverfahren erhalten (Tunmann).

Zu den Pulvinsäurederivaten gehören folgende: 1. Die Vulpinsäure kristallisiert aus Äther oder Alkohol in Prismen, aus Benzol oder Chloroform in dicken Platten: beide Formen sind zitronengelb. Mit dem Ölverfahren wurde Vulpinsäure nachgewiesen bei Cyphelium chrysocephalum, Evernia vulpina, Cetraria pinastri. Außerdem liefert Vulpinsäure bei der Mikrosublimation gelbe Tröpfchen, die nicht zur Kristallbildung gelangen. 2. Pinastrinsäure kristallisiert aus Alkohol und Äther in goldgelben bis orangeroten Prismen und Platten. Das Ölverfahren (ausgeführt bei Lepraria flava, Cetraria pinastri, Lepraria flava quercina) gab goldgelbe zu Büscheln, Garben oder Rosetten vereinigte Nadeln (Unterschied vom Calycin)). Mit Kalilauge wird Pinastrinsäure nicht rot (Unterschied vom Physcion); sie gibt aber ein Sublimat, das aus 1 μ breiten und 20—100 μ langen, geraden oder gebogenen gelben Nadeln besteht. 3. Rhizocarpsäure kristallisiert aus heißem Alkohol in zitronengelben Prismen. Beim Ölverfahren (geprüft an Calycium hyperellum, Acolium tigillare, Rhizocarpon

[1]) Zopf, Die Flechtenstoffe, Jena, 1907.

[2]) E. Bachmann, Mikrochemische Reaktionen auf Flechtenstoffe als Hilfsmittel zum Bestimmen der Flechten, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1886, III, S. 216.

[3]) Em. Senft, Ein neues Verfahren zum mikrochemischen Nachweis der Flechtensäuren, Pharm. Praxis, 1907, VI, Nr. 12.

geographicum [Fig. 69], R. viridiatrum, Pleopsidium chlorophanum) entstehen ganz verschiedene Kristallformen: Prismen in Rosetten, büschel- und fächerförmige Kristalle. strauchförmige Gebilde, derbe harmonikaartig zusammengedrückte Gebilde. Die Kristallform ist von der Menge der Säure abhängig. Die Rhizocarpsäure kann aus dem Gewebe auch durch Sublimation nachgewiesen werden. Das Sublimat besteht aus sechsseitigen Täfelchen. 4. Calycin, welches sich aus Alkohol in feinen Nadeln, aus Benzol, Chloroform oder Eisessig in Prismen von ziegelroter Farbe ausscheidet, liefert beim Ölverfahren (Lepraria chlorina, Lep. flava) dünne, beiderseits zugespitzte, bisweilen etwas gebogene gelbe Nadeln, die meist einzeln liegen oder (selten) lockere Rosetten bilden. Bachmann[1]) hatte ein feinzerriebenes Stückchen des Thallus mit Eisessig betupft und nach dem Verdunsten nadelförmige Kristalle erhalten. Calycinkristalle lösen sich nicht in Kalilauge. Bei der Sublimation erhält man derbe orangegelbe Nadeln. Wird Calycin in Chloroform gelöst und die gelbe Lösung mit Kalilauge geschüttelt, dann färbt sich die Alkalilösung rot, während sich das Chloroform entfärbt (Zopf[2])). 5. Stictaurin (Divulpinsäure) bildet bei langsamem Auskristallisieren aus Äther dünne goldglänzende Täfelchen; bei schnellem Erkalten der heißen Ätherlösung entstehen überwiegend schmale rhombische Prismen. Beim Ölverfahren (Stictaarten) resultieren orangefarbene Nadeln, spindelförmige Gebilde mit rauher Oberfläche sowie kuglige Körper.

Zu den Azetylessigsäurederivaten zählt die Usninsäure (Usnein), die aus Chloroform oder Benzol in gelben, relativ dicken Platten kristallisiert. Aus heißem Öl kristallisieren säulenförmige Kristalle, die zuweilen an einem Ende rechtwinklig abgestutzt sind. Positive Erfolge hatte das Ölverfahren bei Arten von Usnea, Ramalina und Platysma.

Bei Berücksichtigung der Kristallformen ist es nach Senft möglich, mehrere Flechtensäuren einer Flechte nebeneinander nachzuweisen. Die Präparate können nach Verschluß als Dauerpräparate aufbewahrt werden.

Die Säuren der Roccella-, Lecanora- und Ochrolechiaarten (Lecanor-, Erythrin- und Atranorsäure), welche Orcin abspalten, wies Ronceray[3]) mit Hilfe von Vanillinschwefelsäure nach (0.25 g

---

[1]) E. Bachmann, Mikrochem. Reaktionen auf Flechtenstoffe, Flora 1887, LXX, S. 291.

[2]) W. Zopf, Zur Kenntnis d. Stoffwechselprodukte der Flechten, S. 14.

[3]) Ronceray, Contribution à l'étude des Lichens à Orseille, These. Paris 1901, S. 50.

Vanillin, je 2 Vol. Wasser und konz. Schwefelsäure). Es tritt eine violett-rote Färbung ein. Der Orcinnachweis wird sich jedenfalls auch durch unmittelbare Sublimation erbringen lassen. Weitere Reaktionen geben Eisenchlorid (violettrote Färbung) und Chlorkalklösung (rote Färbung).

Bei Untersuchung der Flechten wird man das Buch von W. Zopf, Die Flechtenstoffe, Jena 1907, heranziehen müssen und die neueren Arbeiten von O. Hesse (Liebig Ann. u. Journ. f. prakt. Chem.).

Alkaloide.

Als Alkaloide bezeichnen wir stickstoffhaltige Pflanzenstoffe von basischem Charakter, die den Stickstoff in ringförmiger Anordnung führen. Die Alkaloide bilden mit Säuren Salze, mit Metallchloriden Doppelverbindungen, verhalten sich demnach ähnlich wie das Ammoniak. Die chemischen Forschungen haben ergeben, daß die Alkaloide einen verschiedenen Kern besitzen, der es gestattet, sie in einige Gruppen zusammenzufassen. Man unterscheidet folgende Gruppen: Pyridin-(Piperidin-)gruppe: Areka-, Conium-, Lupinusalkaloide, Piperin, Trigonellin. Pyrrolidingruppe: Coca-, Granatbaum-, Solaneenalkaloide. Chinolingruppe: China- und Strychnosalkaloide. Isochinolingruppe: Viele Opiumalkaloide (Laudanin, Narcein, Narkotin, Papaverin), Hydrastin, Berberin. Phenanthrengruppe: Codein, Morphin, Thebain. Xanthingruppe: Koffein, Theobromin, Xanthin, Theophyllin. Glyoxalingruppe: Pilokarpin. Einige Alkaloide, wie Cocain und Atropin, die sowohl einen Pyrrolidinkern als auch einen Pyridinkern enthalten, können in zwei Gruppen eingeordnet werden.

Das erste Alkaloid (Morphin) wurde vom Apotheker F. Sertürner in Einbeck in Hannover 1805 entdeckt, der bereits auf die chemische Ähnlichkeit des Körpers mit dem Ammoniak hinwies. Robiquet fand 1817 Narkotin, Pelletier und Caventou fanden 1820 Chinin und Cinchonin und gegenwärtig dürften über 300 Alkaloide ermittelt sein. Die erste Synthese (Coniin) gelang Ladenburg 1886. Die Bezeichnung „Alkaloid" wurde zuerst 1819 von Meißner benutzt.

Sehr viele Pflanzenfamilien führen Alkaloide: Coniferen, Palmen, Liliaceen, Amaryllidaceen, Orchidaceen, Piperaceen, Nymphaeaceen, Ranunculaceen, Berberidaceen, Menispermaceen, Papaveraceen, Fumariaceen, Cruciferen, Papilionaceen, Erythroxylaceen, Zygophyllaceen, Rutaceen, Sapindaceen, Sterculiaceen, Theaceen, Punicaceen, Umbelliferen, Loganiaceen, Solanaceen, Rubiaceen, Campanulaceen. Über diese Familien liegen mehr oder weniger eingehende Untersuchungen auf unserem Gebiete vor; sie sind in diesem Buche mitgeteilt. Doch auch in Pilzen, Cacteen, Apocynaceen, Compositen, Asclepiadaceen und in anderen Familien kommen Alkaloide vor und in weiteren werden sie sich bei weiterer Erforschung noch auffinden lassen.

Seit Clautriau haben die meisten Autoren die Alkaloide als Abbauprodukte angesprochen und insbesondere scheint diese Meinung seit Pictets Äußerungen, die dieser aber in keiner Weise durch experimentelle Arbeiten an Pflanzen stützte, die herrschende werden zu sollen. Allerdings sind meist die in

den Alkaloiden enthaltenen Stickstoffmengen recht gering und der quantitative Verfolg der Alkaloide während der Keimung zeigte in verschiedenen Fällen (Datura, Feldhaus, Coca und Strychnos, Tunmann) in den Keimlingen Neubildung an Alkaloiden, während die Endospermalkaloide ausgelaugt, auch in geringer Menge mit den Samenschalen abgeworfen wurden. Die zuvor von Clautriau ausgeführten Experimente hatten nur den Beweis erbracht, daß einige Keimlinge auch bei Entfernung des alkaloidhaltigen Endosperms (oder Samenschale) normal keimen können und in den Pflänzchen neugebildete Alkaloide erscheinen. Anderseits hält Weevers die Xanthinbasen, Molisch das Piperin, Wijsman das Cytisin für Reservestoffe und Comère hat experimentell erwiesen, daß Ulothrix subtilis und Spirogyra crassa bei Ausschluß stickstoffhaltiger Substanz in der Nährlösung Atropin-, Cocain-, Morphinsalze direkt verarbeiten. Offenbar sind die Verhältnisse recht kompliziert, denn Bakterien verhalten sich Strychnin gegenüber ganz verschieden (Ssadikow, 1912). Jedenfalls lassen sich derzeit keine allgemeinen Gesetze aufstellen und man darf nur von Fall zu Fall entscheiden, aber nur auf Grund experimenteller und durch quantitative Bestimmungen gestützter Versuche. Die von Heckel[1]) gegebene Deutung, die Alkaloide der Samen dienen zur Bildung von Chlorophyll und Nitraten, trifft (für Strychnos wenigstens) nicht zu.

Allgemein werden die Alkaloide als Schutzwaffen[2]) gegen Tiere und gegen pflanzliche Parasiten aufgefaßt. Dafür spricht die Giftigkeit der meisten Alkaloide, ihre periphere Lage im Gewebe, ihre Anhäufung in Wundgeweben (Cinchona, Atropa, Corynanthe), ferner, daß sie bei der Keimung ausgelaugt werden und den keimenden Samen mit einer Giftzone umgeben und sich bei Strychnos auch in dem die austretenden Kotyledonen bedeckenden Schleim befinden. Interessant ist das Auftreten der Alkaloide in Raphidenzellen (Amaryllidaceen). Die Raphiden bringen dem Feinde die Wunde bei, das mitfließende Alkaloid vergiftet die Wunde. Die Raphidenzellen stehen derart in Parallele mit den Brennhaaren der Urticaceen. Selbstverständlich kommen Ausnahmen vor. Morphin wird von Tauben, Datura fastuosa von Ziegen, Strychnos- und Atropafrüchte von Vögeln gefressen, Atropablätter nicht nur von Käfern (Haltica atropae), sondern auch von Hasen und Kaninchen. Letztere können bei ausschließlicher Atropa-Nahrung völlig normal ernährt werden. Und vielfach treffen wir die größten Alkaloidmengen im Innern der Gewebe, in Assimilations- und Leitungszellen an.

Die Alkaloide sind in fast allen Zellelementen anzutreffen, sie bevorzugen parenchymatische Gewebe und die peripheren Stellen des Pflanzenkörpers, kommen ferner in Sklereiden (Jatrorrhiza), im Kork (Strychnos) und, wenn auch selten, in Oxalatzellen (Amaryllidaceen) vor, fehlen oft den Siebröhren (die Siebröhren einiger Ranunculaceen sollen nach Vanderlinden Alkaloide führen), bevorzugen aber die Geleitzellen. Besonders reichlich sind sie in den meristematischen Geweben (in Keimlingen von Strychnos vor dem Oxalat) zugegen, sowie in Milch-

---

[1]) Ed. Heckel, Sur l'utilisation et les transformations de quelques alcaloides dans la graine pendant la germination, Compt. rend., 1890, CX, S. 88.

[2]) L. Errera, Efficacité des structures défensives des plantes, Bull. Soc. bot. de Belg., 1886, XXV, Sep.

säften, in denen sie sich schon durch Zusatz von verdünnten Säuren anzeigen. Alle Organe der Pflanze führen Alkaloide, wenigstens in einem bestimmten Entwicklungsstadium. In den Pollenkörnern sind sie bisher nur selten ermittelt (China, Lotsy, Pilocarpus, Tunmann), was wohl mit der Schwierigkeit der Untersuchung zusammenhängt. Es scheint, daß die Alkaloide bei völliger Reife des Pollens schwinden.

Die Wanderung der Alkaloide im Pflanzenkörper ist experimentell durch Pfropfungsversuche erwiesen (A. Meyer und E. Schmidt, Javillier u. a.); auf eine Wanderung wiesen schon die Leitungsbahnen hin, die bei den Reaktionen an Längsschnitten schön hervortreten. Überwiegend sind sie an Säuren gebunden (Apfelsäure, Gerbsäure, Fumarsäure, Akonitsäure, Mekonsäure, Chelidonsäure, aber auch an Salpetersäure, Schwefelsäure u. a.), doch treten sie ebenfalls in glykosidischer Bindung auf (Solanin, Casimirin, Consolidin, Moschatin, Achillein) und ihre Fähigkeit zur Wanderung legt den Gedanken nahe, ob die Glykosidform nicht weit häufiger besteht, als wir zurzeit annehmen. Zur Bildung der Alkaloide ist Belichtung nicht erforderlich, durch geeignete Düngung kann der Gehalt gesteigert werden, doch wie es scheint nur indirekt, durch Aufzucht kräftigerer Pflanzen (Vanderlinden, dieser Forscher machte zuerst hierauf aufmerksam, dann Feldhaus, Chevalier, Mitlacher); ferner ist in unseren Breiten die Temperatur von förderndem Einfluß. Über das Verhalten tropischer Alkaloidpflanzen in unseren Gewächshäusern machten Tunmann und Jenzer Mitteilungen. Alkaloidpflanzen unserer Zone scheinen in den Tropen trotz üppigen Gedeihens zuweilen arm an Alkaloid zu werden, wenigstens wird man aus Angaben von Peckolt hierauf schließen hönnen.

In der lebenden Zelle sind die Basen im Zellsaft und in den Vakuolen des Plasmas gelöst. An Flächenschnitten (Epidermis von Nicotiana, Pilocarpus) kann man die Bildung des Niederschlages mit schwacher Jodlösung verfolgen. Im Plasma selbst entstehen keine Niederschläge. Im Endosperm kommen die Basen im Plasma vor, jedenfalls lassen sich sehr oft selbst bei starker Vergrößerung keine Vakuolen in der mit Aleuron vollgepfropften Zelle erkennen. Hier sind sie jedoch stets mit Öl gemengt, wodurch sie wahrscheinlich auf die Lebenstätigkeit des Plasmas nicht schädlich wirken. Ob die Alkaloide auch in besonderen Körnchen (s. Fritillaria, S. 278) auftreten, bleibt noch strittig.

Seit Howard Kristalle von ausgeschiedenen Alkaloiden in der Chinarinde angetroffen haben wollte, begegnet man in der Literatur wiederholt Angaben über in Drogen auskristallisierte Alkaloide. Doch in keinem Falle werden Identitätsreaktionen mitgeteilt, fast stets fehlen sogar die, übrigens nichts oder doch nur weniges beweisenden Lösungsverhältnisse. Solange eingehende Identitätsreaktionen dieser Gebilde ausstehen (und diese zu erbringen dürfte in vielen Fällen schwierig sein), wird man derartige Angaben mit großer Vorsicht aufnehmen müssen. Der positive Ausfall der Reaktionen zeigt nur die Gegenwart

der Alkaloide an und läßt den Entscheid, ob sich bei der Reaktion auch die Kristalle beteiligen, offen.

Früher war man allgemein der Ansicht, daß die Alkaloide in den Bastfasern entständen. Wigand[1]) sagt: „Die Alkaloide, namentlich das Chinin hat seinen Sitz in der Bastschicht und zwar in den Bastzellen" und Schacht[2]) hält es für wahrscheinlich, „daß alle Alkaloide Produkte der Bastzellen sind und daß auch das Chinin und Cinchonin nur in den Bastzellen der Chinarinden vorkommen"[3]). So konnte es nicht ausbleiben, daß auch in neuerer Zeit einige Mikrochemiker die Alkaloide in den Membranen angetroffen haben wollten und gegenwärtig wird zuweilen behauptet, daß bei Drogen die Alkaloide in den Membranen vorkommen. Die Möglichkeit des Aufsaugens der Basen durch die Membran beim Absterben der Zellen soll nicht bestritten werden, doch sind die bisher angegebenen Fälle meist auf unrichtiges Arbeiten zurückzuführen. Die in den Plasmodesmen angegebenen Alkaloidfällungen bilden nach meinen Befunden nur die bekannte Körnelung der Plasmafäden durch Jodreagentien u. a. (s. Plasmodesmen). Wenn wir berücksichtigen, daß die allermeisten Alkaloide auch beim Absterben der Zellen nicht in die Membran eindringen, so kommt man unschwer zu der Ansicht, daß dort, wo eine postmortale Membranspeicherung erfolgen soll, diese nicht durch die Basen, sondern durch jene Körper verursacht wird, an die die Basen gebunden sind. Vornehmlich Basen, die in gerbstoffartiger Bindung auftreten, können postmortal von den Membranen gespeichert werden. Auch von der Beschaffenheit der Membran wird die Aufsaugung beeinflußt. Verholzte Membranen neigen besonders zur Speicherung.

Ganz besondere Beachtung beansprucht bei mikrochemischen Alkaloidstudien das Material. Genaueren Untersuchungen über die Lokalisation in der Zelle muß lebendes Material zugrunde gelegt werden. Die geernteten Pflanzen sind tunlichst sofort zu untersuchen, enzymatische Prozesse können tiefgreifende Spaltungen herbeiführen. Auch längeres Einstellen der Pflanzen in Wasser ist zu vermeiden. Bei einer fruchttragenden Colchicum, die 9 Tage im Wasser stand, waren in Blatt und Kapsel die am 1. Tage scharf eintretenden Alkaloidreaktionen nicht mehr zu erhalten. Unbedingt erforderlich und Erfolg versprechend erscheinen mir Vergleichsversuche an lebenden und getrockneten Pflanzen, sowie an Pflanzen, deren Enzyme so-

---

[1]) A. Wigand, Lehrb. der Pharmakognosie, Berlin 1863, S. 112.

[2]) Schacht, Anatomie u. Phys. d. Gewächse, Berlin 1856, I, S. 400.

[3]) Wir müssen uns aber daran erinnern, daß Schacht noch die Milchröhren für „Bastzellen" ansprach.

fort in geeigneter Weise (siedender Alkohol?) abgetötet wurden. Die Art der Ausschaltung der Enzymwirkung wird sich nach den Löslichkeitsverhältnissen der nativ auftretenden Alkaloidverbindungen zu richten haben.

Das individuelle Verhalten der Pflanzen hinsichtlich ihres Alkaloidgehaltes ist ebenfalls zu berücksichtigen. Zuerst wurde man aufmerksam auf die Individualität bei Cinchona, dann bei Erythroxylon (de Jong), Pilocarpus, Strychnos, Atropa belladonna (Tunmann). Viele Alkaloidpflanzen weisen eine weitgehende Individualität im Alkaloidgehalt auf, wovon man sich an Topfpflanzen überzeugen kann, die unter gleichen Bedingungen (Belichtung, Wärme, Boden) in Kultur stehen. Wasserkulturen von Strychnos haben mir diese Ansicht bestätigt. Die Mikrochemie hat hiermit zu rechnen. Solange die Basen überall in größeren Mengen auftreten, werden Differenzen dadurch nicht herbeigeführt. Wo aber bei einer an sich alkaloidreichen Pflanze in einem bestimmten Gewebe nur Spuren an Alkaloid zugegen sind, können diese Spuren bei einer alkaloidarmen, auf gleichem Boden und unter gleichen Bedingungen gewachsenen, zweiten Pflanze der gleichen Art fehlen und widersprechende Befunde herbeiführen. „Differenzen verschiedener Autoren im mikrochemischen Alkaloidnachweis sind mithin nicht immer auf fehlerhafte Arbeitsmethoden zurückzuführen, sondern können auch in einem verschiedenen Alkaloidgehalt der unter suchten Pflanzen begründet sein" (Tunmann, 1909). Die Reaktionen müssen an verschiedenen Pflanzen ausgeführt werden. Selbstverständlich werden uns Differenzen im Alkaloidgehalt ebenfalls entgegentreten bei wildwachsenden und kultivierten Pflanzen, die unter verschiedenen Bedingungen wachsen.

Eine andere Fehlerquelle ist bei jenen Objekten gegeben, bei denen noch nicht völlig reife Früchte und Samen untersucht werden müssen und die Alkaloide bei der Reife abnehmen. Die Abnahme erfolgt in bestimmten Schichten bis zum Schwinden. Hier ist naturgemäß das jeweilige Stadium der Reife von großer Bedeutung und kann bei den verschiedenen Autoren ebenfalls zu erheblichen Differenzen führen (s. Conium). Nur systematische Untersuchungen, die alle Entwicklungsstadien berücksichtigen, können dann zu einwandfreien Ergebnissen führen.

Bei den Lokalisationsangaben findet man in der Literatur vorzüglich Differenzen über das Auftreten der Alkaloide im Blatte. Einige Autoren finden die Basen in der Epidermis, andere auch oder nur in angrenzenden chlorophyllhaltigen Zellen (Palisaden). In dieser Hinsicht sei auf die Tatsache hingewiesen, daß die inneren tangentialen Wände der Epidermiszellen oft große Tüpfel führen,

so daß ein schneller Übertritt der Basen in benachbarte Zellen (vielleicht erst bei der Präparation) nicht ausgeschlossen erscheint.

Beim mikrochemischen Alkaloidnachweis sind Kontrollreaktionen unbedingt erforderlich, da wir nicht im Besitz völlig einwandfreier Reaktionen sind und unsere Reagentien nicht nur mit Alkaloiden, sondern auch mit Eiweißstoffen, Bitterstoffen (Laktonen), zum Teil auch mit Gerbstoffen reagieren. Selbst organisierte Gebilde (Zellkern, Chromatophoren) können zu Irrtümern Anlaß geben (s. Fig. 70). Es müssen Schnitte (S. 22) geprüft und mit + Schnitten verglichen werden. Von allen Flüssigkeiten, die zur Herstellung alkaloidfreier Schnitte empfohlen wurden, kann nur der Weinsäure-Alkohol (1 : 20) allgemein benutzt werden. Die Entfernung der Alkaloide mit Weinsäure-Alkohol wurde von Stas (Liebigs Ann., 1853, LXXXIV, S. 379) angegeben, von Otto (Anl. z. Ausmitt. d. Gifte, III. Aufl., S. 35) verbessert und gelangte auf unserem Gebiete zuerst durch Errera[1]) zur Anwendung. Über die Dauer der Mazeration entscheidet die Beschaffenheit des Materials. Die Angabe Molles (1895), daß sich die Basen schon durch 15—25 Minuten langes Eintauchen der Schnitte in Weinsäure-Alkohol entfernen lassen, kann für die von ihm untersuchten vegetativen Teile der Solaneen hier und da zutreffen, hat aber keine allgemeine Gültigkeit. Bei Samen und Früchten (Conium, Barth, 1898), zumal bei starkwandigen (Strychnos) gelingt die Entfernung sämtlicher Alkaloide erst nach mehreren Tagen. Vergleichende Prüfungen führten zu dem Schluß, daß selbst diese Zeit nicht immer genügt, „namentlich dann nicht, wenn man das Mazerationsgefäß nicht umschütteln kann. Man mazeriert am besten gleich bei Beginn einer Untersuchung eine größere Anzahl Präparate in einem kleinen, geschlossenen Arzneifläschen mindestens eine Woche lang unter häufigem Umschütteln und entnimmt die Präparate bei Bedarf, muß sie aber vorher auswaschen“ (Tunmann, 1909). Die Alkaloide sind nun entfernt, die Eiweißkörper im allgemeinen aber nicht (Ritthausens Fibrin ausgenommen). Nun werden Parallelreaktionen an + und — Schnitten vorgenommen. Die Reaktionen sind Fällungs- oder Farben-

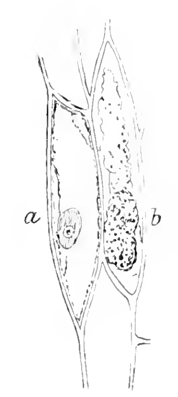


Fig. 70. Allium porrum (Epidermis), *a*) eine lebende Zelle m. Zellkern, der bei *b*) nach Einwirkung von Platinchlorid einen aus dem Zellsaft entstandenen Niederschlag vortäuscht (Tunmann).

---

[1]) L. Errera, Sur la distinction microchimique des alcaloides et des matières protéiques, Ann. d. l. Soc. Belg. Micr., 1889, XIII, S. 118.

reaktionen. Daneben gelangen noch Spezialreagentien zur Anwendung, vornehmlich aber Jod-, Brom- und Säuredämpfe (S. 14). Schwer sichtbare Fällungen werden durch Umsetzungen weiter identifiziert (S. 13).

Die Zusammensetzung der hauptsächlichsten Alkaloidreagentien ist nachstehend angegeben. Die besten und allgemein benutzbaren Reagentien sind an die Spitze gestellt.

Brombromkalium (Siim Jensen, 20,0 Kaliumbromid, 100,0 Wasser, Brom im Überschuß) ist ein vorzügliches Reagens, da die Stärke nur braun gefärbt wird, ebenso Bromwasser (Barth, konz. wässerige Lösung von Brom). Zuweilen wirken verd. Lösungen besser (Tunmann). Gleich gut wirkt Jodjodkalium (Bouchardat, Errera, am besten aus 1,0 Jod, 1,0 Kaliumjodid in 100 ccm Wasser, zuweilen ist eine $^1/_2$ % Lösung geeigneter, Pilocarpus). Der Niederschlag ist fast stets amorph und löst sich in unterschwefligsaurem Natron; gleichzeitig werden Stärke, Eiweißkörper u. a. gefärbt, wodurch der Niederschlag oft schwer sichtbar wird. Chlorzinkjod (Barth, 20,0 Chlorzink, 6,5 Kaliumjodid, 1,3 Jod, 10,5 Wasser) hat beschränkten Wirkungskreis, da nicht nur Stärke, sondern auch Zellulose u. a. gefärbt werden, ein Nachteil, der besonders bei längerer Einwirkung sehr ins Gewicht fällt. Sehr gute Resultate geben ferner: Kaliumquecksilberjodid (Mayer, 1,354 Quecksilberchlorid, 4,97 Kaliumjodid in 100,0 Wasser), ferner nach Herder: Caesium-, Calcium-, Strontium-, Baryumquecksilberjodid (diese werden bereitet aus je 1,354 Quecksilberchlorid in 100,0 Wasser und 7,77 Caesiumjodid, oder 4,394 Calciumjodid, oder 6,725 Strontiumjodid oder 6,389 Baryumjodid). Die entstehenden Niederschläge sind im allgemeinen schwer löslich und zwar um so schwerer, je höher das Atomgewicht der benutzten Alkali- resp. Erdalkalimetalle ist. Die Kristallisation der Niederschläge wird gefördert durch Anwendung der Reagentien in 30 % wässeriger Chloralhydratlösung. Die Bestandteile werden statt in Wasser in Chloralhydrat gelöst. Dadurch werden die Präparate gleichzeitig aufgehellt. Leider wird durch Anwendung der Chlorallösung die Empfindlichkeitsgrenze ganz bedeutend herabgesetzt. Kaliumwismutjodid (Dragendorff, Wismutjodid in konz. wässeriger Jodkaliumlösung in der Wärme gelöst, das heiße Filtrat wird mit dem gleichen Vol. kalt gesättigter Jodkaliumlösung versetzt. Haltbarer ist die Lösung nach Thresh: 1,8 Kaliumjodid, 45 ccm Salzsäure, 30 ccm Liquor Bismuti [dieser aus: 2,5 Wismut in 70,0 Salpetersäure gelöst, mit 60,0 Zitronensäure versetzt, durch Ammoniak schwach alkalisch gemacht und mit Wasser auf 600 ccm aufgefüllt]). Zu den besten Reagentien zählen Platin- und Goldchlorid (1:20), die kristallinische, schwer lösliche und gut sichtbare Niederschläge geben und im Verein mit den Jodreagentien zur Diagnose ausreichen. Zusatz einer Spur Salzsäure befördert die Kristallisation. Nicht ganz so gut wirkt Quecksilberchlorid (3 % wässerige Lösung).

Brauchbare Farbenreaktionen erhält man mit den folgenden Reagentien: Reine Schwefelsäure (konz. und in bestimmten Fällen verdünnt) und reine Salpetersäure. Erdmanns Reagens (10 Tropfen verd. Salpetersäure [aus 10 Tropfen 30 % Salpetersäure in 100 ccm Wasser], 20 g reine konz. Schwefelsäure). Die Schwefelsäure läßt sich vorteilhaft durch eine hochprozentige wässerige

Chloralhydratlösung ersetzen, so beim Nachweis von Morphin, Narkotin, Brucin. Diese Färbungen zeichnen sich durch relativ größere Haltbarkeit aus [1]. Vanadinschwefelsäure (Mandelin, Ammoniumvanadanat 0,1, reine konz. Schwefelsäure 20,0) färbt Strychnin blauviolett, Atropin gelbrot, Akonitin hellbraun, Brucin blutrot, Colchicin und Coniin grün, Digitalin dunkelbraun, Chinin blaugrün. Molybdänschwefelsäure (Froehde, molybdänsaures Natrium 0,01, konz. Schwefelsäure 1 ccm, frisch bereiten; ähnlich wirkt molybdänsaures Ammonium 0,1, konz. Schwefelsäure 1,6, durch Erwärmen gelöst, Buckingham). Beschränkte Verwendung besitzen Cersulfatschwefelsäure (0,1 Cersulfat in 10 ccm Schwefelsäure) und Selenschwefelsäure (Lindt, 5 Tropfen Selensäure, spez. Gew. 1,4 und 1—2 Tropfen Salpetersäure, spez. Gew. 1,2 oder nach Reuteln: 0,3 selensaures Natrium, 8,0 Wasser, 6 ccm Schwefelsäure).

Wenig eingeführt hat sich, wie es scheint, Natronlauge (10 %); sie gibt amorphe, selten kristallinische Fällungen, die jedoch gut sichtbar sind. Weniger Beachtung verdient jetzt Kalilauge (10 %), die vielfach früher benutzt wurde (China) und alkoholische Ammoniaklösung (China), die auch mit Pflanzensäuren reagiert und meist erst nach dem Verdunsten die Niederschläge erkennen läßt. Nur in einzelnen Fällen wird man Ferro- und Ferricyankalium, Rhodankalium, Kaliumdichromat (sämtlich in 5 % wässeriger Lösung, Barth) heranziehen, sowie Kupfersulfat (10 %, bei Conium). Pikrinsäurelösung (1 : 100, die Lösung dringt schwer in die Gewebe und liefert meist amorphe Niederschläge; bessere Resultate erzielt man mit folgender Lösung: 5,0 konz. wässerige Pikrinsäurelösung, 20,0 Wasser, 0,5 Salzsäure, Tunmann). Nicht viel besser wirkt Pikrolonsäure (von Matthes und Ramstedt [Arch. d. Pharm., 1907] bei narkotischen Präparaten benutzt, von Tunmann bei Schnitten, 0,1 Pikrolonsäure, 8, Alkohol, 7, Wasser). Formaldehydschwefelsäure (Denigès, 2 ccm 40 % Formaldehyd in 100 ccm Schwefelsäure), Morphin karminrot, heiß blau, Codein violettblau, Narkotin violett, Narcein gelb-rotbraun, Thebain rotorange, Papaverin violett. Perhydrolschwefelsäure, mit Geweben noch nicht versucht (Schaer, 1 Vol. Perhydrol Merck, 10 Vol. Schwefelsäure, gemischt und gekühlt), Chinin zitronengelb, Strychnin purpurrot, Brucin rötlichgelb, Opiumalkaloide orange bis purpurrot, Berberin kirschrot, Hydrastin schokoladenbraun, Emetin orangerot, Nikotin schokoladenrot, Veratrin kirschrot-gelbbraun. Kaliumcadmiumjodid (Marmé, 1 Teil Cadmiumjodid, 2 Teile Kaliumjodid, 7 Teile Wasser) steht den anderen Jodreagentien bedeutend nach. In schwach schwefelsaurer Lösung (Lepage) ist die Wirkung ebenfalls nicht viel besser. Tannin (10 % wässerige Lösung), gibt zwar bräunliche Fällungen, dringt aber sehr schwer ein und die zuerst von Barth empfohlene mehrtägige Mazeration größerer Pflanzenstücke ist umständlich und lohnt nicht die zeitraubende Arbeit (beim Schneiden wird oft alles mißfarbig, sogar schwarz). Eisenchlorid (Barth, in 5 % Lösung) wird man nur selten einmal heranziehen (Gerbstofffällungen). Ganz entbehrlich sind: Phosphormolybdänsäure (Sonnenschein, eine salpetersaure Lösung von Ammoniummolybdat,

[1] E. Schaer, Über die Verwendung konzentrierter Chloralhydratlösungen, Schweiz. Wochenschr. f. Ch. u. Ph., 1910, XLVIII, S. 618.

wird mit Phosphorsäure gefällt, der Niederschlag wird ausgewaschen und mit Königswasser gekocht, bis alles Ammoniak zersetzt ist, dann wird zur Trockne verdampft und die Phosphormolybdänsäure in 10 % Salpetersäure gelöst). Phosphorwolframsäure (Scheibler, eine Lösung von Natriumwolframat wird mit etwas offizineller Phosphorsäure versetzt).

Über die Höhe der Alkaloidmengen in den einzelnen Zellen liegen wenige Angaben vor. Selbst Wahrscheinlichkeitsberechnungen sind mit sehr großen Fehlern behaftet. Gerock und Skippari berechnen die Größe einer Endospermzelle des Strychnossamen mit 0,00020475 mm³ und daraus und aus dem spezifischen Gewicht der Samen das Gewicht einer Zelle mit 0, 00027314 mg. Nun nehmen sie 5 % Alkaloid und zwar Strychnin zu Brucin im Verhältnis 1 : 2 an, so daß eine Endospermzelle 0,000004552 mg Strychnin und 0,000009104 mg Brucin enthalten würde. Es muß bemerkt werden, daß der Alkaloidgehalt recht hoch angenommen ist. Meist finden sich 2—3 % Alkaloide, dann würden sich die berechneten Mengen um fast 50 % erniedrigen. Herder meint nun, daß beim Eintragen mehrerer Schnitte in einen Tropfen Reagenslösung diese Schnitte 500 Zellen enthalten könnten, und glaubt „daraus als höchste Durchschnittsempfindlichkeitsgrenze einer Reagenslösung das Verhältnis 1 : 7323“ beim Strychnossamen angeben zu dürfen. Diese Berechnung wäre doch nur dann zulässig, wenn die Alkaloide sämtlicher Zellen heraustreten und auf einmal im Untersuchungstropfen in Reaktion treten würden. Derartige Fälle haben wir allerdings häufig, meist dort, wo die Niederschläge im Reagenstropfen oder auf den Schnitten entstehen. Bei Strychnos und stets bei Bildung von Niederschlägen innerhalb nicht angeschnittener Zellen muß doch die Alkaloidmenge jeder einzelnen Zelle für sich in Reaktion treten. Man wird sagen können, daß Reagentien, die unter 1 : 10000 reagieren, nur in Ausnahmefällen in den Zellen selbst Reaktionen auslösen werden. Nach Kellers makrochemischen Befunden reagiert Kaliumdichromat mit Emetin und Cephaelin nur 1 : 1000 und ich habe, entgegen der Literatur, in Schnitten von Uragoga niemals Reaktionen mit diesem Reagens erhalten. Ein junges Teeblatt führt kaum 0,002 g Coffein. Daher die Schwierigkeit in der Lokalisationsermittelung, die durch den anwesenden Gerbstoff noch erhöht wird. Ein Blütenstielchen von Pilocarpus enthält im Mittel nur 0,002 g Alkaloid. Nehmen wir an, daß dieses nur 7 mm lang sei und etwa 200 Schnitte gäbe. Mit jedem Schnitt von 35 μ Dicke erhalten wir eine intensive Reaktion in den Zellen. Da aber ein solcher Schnitt mindestens 250 Alkaloidzellen führt, so können es nur Bruchteile eines Mikromilligramms an Alkaloid sein, die die Reaktion bedingen; denn bei Alkaloidpflanzen werden die makrochemischen Befunde über den Gehalt den Tatsachen nahe kommen.

Die Empfindlichkeitsgrenze für einige chemisch reine Alkaloide hat Springer[1]) ermittelt. Zur Ausführung wurden zwei Tropfen Reagenslösung zu $^1/_2$ ccm Alkaloidlösung zugefügt, welche sich in einem, auf schwarzer Unterlage ruhenden Uhrglase befand, und der innerhalb $^1/_2$ Minute entstehende Niederschlag beobachtet. Die gefundenen Werte bieten auch für unsere Zwecke Interesse, wenn auch die Brauchbarkeit der Alkaloidreagentien in der Pflanzenmikrochemie keineswegs von einer hohen Empfindlichkeitsgrenzen allein abhängt. Die Empfindlichkeitsgrenze betrug 1 zu den angegebenen Werten bei wässerigen Lösungen reiner Alkaloide, die mit Ausnahme von Brucin und Atropin mit 1 % Alkohol versetzt waren. Die angeführten Zahlen geben die Werte in Tausenden, die Empfindlichkeitsgrenze von KHgJ mit Brucin ist daher 1 : 25000, mit Koniin 1200.

	Brucin	Atropin	Chinin	Koffein	Veratrin	Koniin	Nikotin
KHgJ[2])	25	10	100	—	15	1,2	15
Ta	8	3	1,2	3	2	0,1	0,5
Pl	1,5	1,2	0,7	0,06	0,5	0,1	5
Au	28	4	14	0,4	6,5	0,1	10
Jjk	40	40	150	3	15	10	1
Pi	2,850	0,5	30	—	1,2	0,1	5
Pmo	2	2	8	—	3	2,5	12
Pw	1,4	0,8	4	—	1	1	10,5
Kcdj	12	1,2	8	—	5	1	10
Kznj	4	1	6	—	4	0,8	7,5
Wij	5	4	50	60	6	6	20

	Morphin	Narcein	Kodein	Thebain	Strychnin	Akonitin	Emetin
KHgJ	1	0,4	10	50	65	12,8	25
Ta	0,3	2	0,06	8	2	2	6,5
Pl	0,12	0,3	0,2	0,9	2,5	—	3
Au	3	2,2	2,5	16	16	6,4	3,2
Jjk	14	12,8	65	50	65	15	25
Pi	—	1,5	0,5	6,4	9	1	25
Pmo	6	2,5	10	25	3,2	2,5	3,2
Pw	6	2	8	12,8	3	2	1,5
Kcdj	1	1,5	1,5	12,5	12	3,5	25
Kznj	0,3	1,5	0,8	10	0,4	3,5	15
Wij	5	10	40	60	200	10	25

[1]) E. Springer, Die Empfindlichkeit der Alkaloidfällungsreagentien und ihre Fällungsgrenzen, Apoth.-Ztg., 1902, XVII, S. 201.

[2]) KHgJ = Kaliumquecksilberjodid, Ta = Tannin, Pl = Platinchlorid, Au = Goldchlorid, Jjk = Jodjodkalium, Pi = Pikrinsäure, Pmo = Phosphormolybdänsäure, Pw = Phosphorwolframsäure, Kcdj = Kaliumcadmiumjodid, Kznj = Kaliumzinkjodid, Wii = Wismutjodidjodkalium.

Im folgenden sind die Fällungsgrenzen der betreffenden Alkaloide in sauren Lösungen mit den gleichen Reagentien zusammengestellt:

	Brucin in $H_2O + 3 SO_4H_2$	Atropin in $H_2O + 3 SO_4H_2$	Chinin $+ 3 HCl$	Koffein $+ 3 SO_4H_2$	Veratrin $+ 5 HCl$	Solanin $+ 5 HCl$	Cinchonin $+ 2 SO_4H_2$
KHgJ . . .	50	15	130	22	20	10	250
Ta	6,4	3,5	1,5	4	2,3	2	250
Pl	1,5	1,5	0,9	0,08	0,45	0,4	4
Au	25	4,5	12,5	0,85	6,4	1	160
Jjk	65	65	200	4	20	—	200
Pi	5	0,5	40	—	2	0,8	110
Pmo	8	16	30	32	12	4	100
Pw	6,4	1,5	20	12	6	2,5	240
Kcdj . . .	8	1,8	9	—	5	2	100
Kznj . . .	2	0,85	6,5	—	3,5	2	65
Wij	10	5	150	100	8	35	200

	Koniin $+ 3 HCl$	Nikotin $+ 3 HCl$	Morphin $+ 3 HCl$	Narkotin $+ 3 HCl$	Narcein $+ 3 HCl$	Kodein $+ 3 PO_4H_3$	Thebain $+ 5 HCl$	Strychnin $+ 3 NO_3H$	Akonitin $+ 3 HCl$	Emetin $+ 5 HCl$
KHgJ . . .	1	20	1,2	50	12,8	13	60	100	12,8	35
Ta	0,1	1	0,5	6,4	2	0,15	10	3,4	3,2	6,5
Pl	—	5	0,2	0,8	0,6	0,275	1	2	—	0,8
Au	—	120	4,2	12	4	3	16	15	8	2,5
Jjk	10	20	24	50	25	100	80	100	22	25
Pi	—	6	—	6,4	3,2	0,6	6,4	10	1,6	32
Pmo	10	40	20	14	4	50	50	60	6,4	6,4
Pw	6	21	20	12,8	4	30	25	100	7,5	3,2
Kcdj . . .	1	11	1,8	10	4	1,5	8	8	3	12,8
Kznj . . .	0,8	8	0,6	10	3,2	0,8	8	2	3,5	15
Wij	10	40	16	25	20	60	80	400	11	28

Die mit pflanzlichen Objekten erhaltenen Alkaloidfällungen stimmen in der Kristallform nur selten mit jenen überein, die chemisch reine Alkaloide am Objektträger geben. In der Pflanze liegen die Alkaloide in einer Form vor, die uns vielfach noch unbekannt ist, und andere Pflanzenstoffe modifizieren die Reaktionsprodukte, verhindern häufig die Kristallisation. Zudem geben die Alkaloide nur in konzentrierter Lösung typische Kristallformen. Die von Vadam[1]) beschriebenen Fällungen wurden mit Alkaloidlösungen 1 : 200—1 : 400 erzielt. Beschrieben werden die Niederschläge von Morphin, Codein, Narcein, Papaverin, Narcotin, Cicutin, Thebain, Cocain, Brucin, Strychnin, Coffein, Nicotin, Atropin, Pilocarpin, Spartein. Als Reagentien dienen Jodjodkalium, Kaliumkadmiumjodid (Lepage), Gold- und Platinchlorid, Pikrinsäure, Kaliumdichromat, Ferro- und Ferricyankalium. Auch Pozzi-Essot[2]) hat bei einigen chemisch reinen Alkaloiden die Reaktionsprodukte beschrieben. Es gaben: Strychnin (und Brucin) mit Platinchlorid bis 130 μ lange sternförmig angeordnete Prismen, Strychnin mit Goldchlorid zu Gruppen vereinte Prismen, Chinin mit Platinchlorid Körnchen, mit Jodjodkalium Prismen, Cocain mit Platinchlorid dichte Prismen, mit Goldchlorid dendritische Bildungen, Atropin mit Jodjodkalium 4—5 μ große Kristalle, Morphin mit Jodjodkalium distelkopfähnliche Kristalle.

Bei der Untersuchung von Pflanzen, über die makrochemische Befunde noch nicht vorliegen oder deren Alkaloide zu Kontrollreaktionen nicht im Handel zu haben sind, wird man nach dem Verfahren von Stas-Otto (Ausziehen des zerkleinerten Materials mit Weinsäure-Alkohol und Reinigen der Auszüge; näheres in den Lehrbüchern der Chemie und Toxikologie, E. Schmidt, J. Gadamer u. a.) eine kleine Menge von Rohalkaloiden herstellen und mit diesen Aufklärungsreaktionen ausführen. Vielfach, doch keineswegs immer, werden botanisch nahestehende Pflanzen ähnliche Spezialreaktionen geben.

Coniferae.

Taxus.

Taxin kommt in Blättern und Früchten von Taxus baccata vor und wird mit Äther aus den Blättern ausgezogen (Ausbeute 0,2 %). Der Arillus enthält

---

[1]) Ph. Vadam, Différenciation des alcaloides au moyen de leurs précipités microcristallins, Journ. de Pharm. et de Chim., 1897, 6 sér. V, S. 100.

[2]) M. E. Pozzi-Essot, Contributions à la rech. microch. d. alcaloides, Compt. rend., 1901, CXXXI, S. 1062.

kein Taxin. Die Konstitution ist noch unbekannt, es zählt zu den Pyridinbasen. Taxin vertritt in seiner Funktion das in Taxus fehlende Harz[1].

Zur Ermittlung der Lokalisation des Taxins gebrauchte Russell[2] das mit wenig Wasser verdünnte Mandelinsche Reagens (hellrote Färbung, Gerbstoffe sollen hierbei nicht in Reaktion treten), Fraudes Reagens (Überchlorsäure, rotviolette Färbung), sowie konz. Schwefelsäure (purpurviolett). In den Alkaloidzellen entstehen mit Jodjodkalium orangebraune, mit Sublimat graue, mit Phosphormolybdänsäure graubraune Niederschläge. Am reichlichsten fand sich Taxin in den Vegetationspunkten und in völlig ausgewachsenen Organen.

Monocotyledonen.

Palmae.

Areca catechu.

Die Samen von Area catechu enthalten mehrere Alkaloide, Arecolin, Arecain, Guvacin u. a. (Bombelon, Jahns u. a.), in größerer Menge (bis zu je 0,1 %) sind nur Arecolin (der Methylester der Tetrahydromethylnikotinsäure) und Arecain zugegen.



Fig. 71. Areca catechu (Samen), Endosperm, in der Mitte Rumination. Arecolinausscheidungen mit Salpetersäuredampf (links), mit Pikrolonsäure (rechts). (Tunmann).

Arecolin läßt sich mit nachstehenden Reagentien nachweisen: Jodjodkalium, Kaliumwismutjodid[3] (rotbraune, undeutlich kristallinische Ballen), Pikrinsäure, Goldchlorid[4], Pikrolonsäure, (gelbe Ballen und Sphärokristalle, Fig. 71)[5], Platincyanid (bei Umrandung des Deckglases mit Wachs nach mehreren Stunden kleine Kristalle), konz.

[1]) R. Neumann, Aus Leben, Sage und Geschichte der Eibe, Ber. Gymnas. Bautzen, ref. in Bot Centralbl., 1910, CXIII, S. 221.

[2]) W. Russell, Recherches sur la localisation de la Taxine chez l'If, Assoc. Montauban, 1902, S. 693.

[3]) Th. Osenbrüg, Über die Entwicklung des Samens der Areca catechu L. u. die Bedeutung der Ruminationen, Dissertation Marburg, 1894.

[4]) H. Barth, Studien über den mikrochemischen Nachweis von Alkaloiden in pharmaz. verwend. Drogen, Dissertation, Zürich, 1898, S. 40.

[5]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie der Arekanuß, Pharm. Post, 1911, XLIV, S. 703.

Salzsäure (schwach gelbe Kristallballen), Salz- oder Salpetersäuredämpfe (nach 2—3 Tagen Kristalle). Die mit Säuredämpfen behandelten Präparate werden in Paraffinöl durchmustert (Fig. 71). Kaliumpermanganatlösung, die braunen Niederschlag hervorruft, liefert eine unklare Reaktion. Die Reaktionen lassen sich recht gut mit den Nuces Arecae des Handels erzielen. Präparate lassen sich aus dem zerklopften Samen mit starkem Messer bequem anfertigen. Die schnellste Reaktion liefert Kaliumwismutjodid. Einige Präparate werden in einen kleinen Tropfen verdünnter Salzsäure gelegt (1 : 10), so daß die Schnitte gerade befeuchtet sind und sich glatt rollen, dann wird das Deckglas aufgelegt und das Reagens zugefügt. Bereits nach wenigen Minuten füllen sich die Endospermzellen mit rotbraunen Ballen an, deren kristallinische Natur aber nur am Rande der Ballen und Klumpen zu erkennen ist. Natürlich müssen — Präparate zum Vergleich herangezogen werden.

Das Alkaloid Arecain läßt sich gut mit Natronlauge nachweisen (graugelbe Kristallballen).

Der Sitz der Alkaloide ist nur das Endosperm (Barth, Tunmann) und nicht, wie Osenbrüg meinte, das Ruminationsgewebe.

Liliaceae.

Colchicum autumnale.

Colchicin (Pelletier und Caventou 1820), aus dem Samen von Colchicum autumnale gewonnen, stellt eine gelbliche amorphe Masse dar, die mit Mineralsäuren eine Reihe charakteristischer Farbenreaktionen gibt, mit den allgemeinen Alkaloidreagentien aber erst in konzentrierten Lösungen reagiert. Colchicin kommt (nach Albo in freiem Zustande) in allen Teilen von C. autumnale vor, im Knollen (0,2 %), in Blättern (Spuren), in Blüten (0,1 %), im Samen (je nach der Reife und dem Lagern 0,2—0,4 %), vornehmlich in der Samenschale (bis 0,4 %). Auf den Alkaloidgehalt ist die Witterung von großem Einfluß (ob nur indirekt?). In den kalten Sommern 1909 und 1910 nahm der Gehalt der Samen wildwachsender Pflanzen der Rhonegegend stark ab[1]; er betrug 1907: 0,19, 1908: 0,16, 1909: 0,144, 1910: 0,148 %. Nach Herrmann findet Colchicin „im Pflanzenkörper Verwendung als Reservenahrungsstoff" (?).

Die einwandfreie Ermittlung des Colchicins im Gewebe ist schwierig. Herrmann[2]) erhielt mit Ammoniak in den Alkaloidzellen eine intensive Gelbfärbung. Lindt[3]) findet im Siebteil der Zwiebelschuppen mit Schwefelsäure-Salpetersäure Colchicinreaktion (violettrote Färbung).

---

[1]) J. Burmann, Schweiz. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1911, XLIX, S. 6.

[2]) O. Herrmann, Nachweis einiger organischer Verbindungen in den vegetabilischen Geweben, Dissertation, Leipzig 1876, S. 18.

[3]) O. Lindt, Über den mikrochem. Nachweis von Brucin und Strychnin, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, S. 237.

Da die Reaktion an mit Petroleumäther entfetteten Schnitten ausbleibt, so soll die Färbung dem Fette zukommen. Wir wissen aber jetzt durch die makrochemischen Untersuchungen von Dragendorff, C. C. Keller u. a., daß bei der Extraktion mit Petroleumäther zugleich mit dem fetten Öle größere oder kleinere Anteile an Alkaloiden den Präparaten entzogen werden. Maistriau[1]) erhielt mit Salzsäure oder mit schwach verd. Schwefelsäure (1 Teil Säure + 2—3 Teile Wasser) eine gelbe Farbenreaktion, mit konz. Schwefelsäure, der 1 Tropfen Salpetersäure zugesetzt ist (oder mit Schwefelsäure, die einige Kristalle Kaliumnitrat enthält — die genaue Zusammensetzung ist im Original nicht angegeben) eine anfangs violette, dann braune Färbung. Jodjodkalium gibt einen kermesbraunen körnigen Niederschlag, der beim Erwärmen nicht verschwindet, aber nach längerer Zeit selbst in der Kälte sich auflöst. Der Niederschlag erscheint körniger, wenn die Präparate zuvor mit Salzsäure oder Schwefelsäure betupft werden. Jodquecksilberjodkalium bewirkt nach vorangegangener Ansäuerung mit Salzsäure einen chromgelben Niederschlag. Im Gegensatz zu Barth (s. unten) soll Tannin keine guten Resultate und Pikrinsäure überhaupt keine Reaktion geben. Die Unstimmigkeit ist erklärlich. Maistriau ließ die Reagentien unter Deckglas auf die Präparate einwirken, Barth legte größere Gewebestücke 8 Tage in die betreffenden Lösungen ein und stellte nach oberflächlichem Abspülen mit Wasser aus ihnen erst die Präparate her. Nachprüfungen bestätigen die Angaben Barths hinsichtlich der Pikrinsäure. Die Tanninreaktion zeigte sich aber zu unklar.

Kürzere Mitteilungen liegen von Rosoll[2]) und Paschkis[3]) vor. Letzterer gibt an, daß sich Präparate aus Knollen und Samen „mit Salzsäure und unterchlorsaurem Natron" rosenrot färben. Nach einiger Zeit soll ein körniger Niederschlag entstehen. Bei Nachprüfungen erwies sich das Reagens in Knollen und Samen als unbrauchbar. Die eintretende Färbung (dunkelgelb) ist wahrscheinlich nur durch die Salzsäure bedingt. Erst Barth (Lit. S. 270, Anm. 4) kontrolliert die Reaktionen an — Schnitten, zu deren Herstellung Weinsäure-Alkohol benutzt wird. Bei lebendem Material (Knollen, Blätter) entfernt man die Alkaloide schneller durch heißen Alkohol (mehrere Minuten). Blau[4])

[1]) Maistriau in: Errera, Maistriau, Clautriau, Prem. rech. s. l. localisat et signif. des Alcaloides d. l. pl., Bruxelles. Sep. 1887, S. 8—12.

[2]) A. Rosoll, Über den mikrochem. Nachw. d. Glykoside u. Alkaloide in den vegetab. Geweben, Jahresber. d. Realgymnas. zu Stockerau, 1889—90.

[3]) Paschkis, Realenzykl. d. ges. Pharm., I. Aufl., III, S. 212.

[4]) H. Blau, Der Colchicingehalt der Herbstzeitlosensamen, Ztschr. allg. österr. Apoth.-Vereins, 1903, XLVII, S. 1067.

geht nur auf den Nachweis im Samen ein, wobei er dünne Schnitte verwendet, die er erst mit konz. Salpetersäure, dann mit Wasser und endlich mit Natronlauge behandelt und dadurch eine anfangs dunkelviolette, dann gelbe und schließlich ziegelrote Färbung erzielt. Der braune Farbstoff der Samenschale wurde zuvor entfernt durch kurze Mazeration der Präparate in Äther (s. oben).

Trotzdem nun die von den verschiedenen Autoren benutzten Reagentien im allgemeinen die gleichen sind, zeigen die Angaben über die Lokalisation des Colchicins Abweichungen. Im Knollen finde ich das Alkaloid übereinstimmend mit Maistriau in der äußeren Epidermis der weißen Schuppe und in den Gefäßbündelscheiden. Diese Gewebe sind stärkefrei. Herrmann fand es nur in 2—3 stärkefreien Zellreihen in der Umgebung der Bündel. Das scheint in erster Linie die Gefäßbündelscheide zu sein. Barth erhielt mit Pikrinsäure außerdem noch im Phloem einen Niederschlag. Zutreffend sind seine Befunde, daß in der Vegetationsspitze und unterhalb dieser das Alkaloid ziemlich gleichmäßig in allen Zellen auftritt. Nach Albo[1]) gelangt das Alkaloid von der alten in die neue „Zwiebel", von dort in die Knospen und in alle Zentren von Neubildungen(?). Alkaloidhaltig sind ferner die Parenchymzellen der Plazenta und die Epidermen der Fruchtwand (Fig. 72). In abgestorbenen Zellen soll sich niemals Alkaloid finden. Im Stengel gibt es Maistriau in Epidermis und Bündelscheiden, in Blättern in der Epidermis an. Doch fand ich größere Mengen als in der Epidermis in den Bündelscheiden der Nerven. Über die Lokalisation im Samen bestehen Differenzen; die Hauptmenge findet sich jedenfalls in den beiden inneren Zellreihen der Samenschale (Fig. 73b) und zwar im reifen Samen.

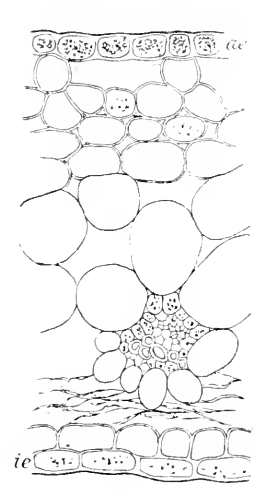


Fig. 72. Colchicum autumnale. Fruchtwand, Querschnitt (nicht ganz reife Kapsel). Alkaloidfällung mit Brombromkalium (*ae* = äußere, *ie* = innere Epidermis) (Tunmann).

Nach Maistriau und Albo ist das Endosperm alkaloidhaltig, ein Befund, der allgemein in die botanische Literatur übergegangen ist, nach Herrmann die Samenschale, während sich „im Endosperm nur

---

[1]) G. Albo, Sur la signification physiologique d. la Colchicine dans les différentes espèces de Colchicum et de Merendera. Arch. Sciences phys. et nat. 1901, XII, S. 10.

in dickeren Schnitten Spuren" finden. Zu dem gleichen Ergebnis kam Barth auf entwicklungsgeschichtlichem Wege. Colchicin ist im unreifen Samen „in der aus quadratischen Zellen bestehenden Schicht, die auf der Seite, wo die Caruncula ansetzt, 2—3reihig ist", im reifen Samen vorzüglich in der Samenschale, in kleinen Mengen in den „Öltropfen im Endosperm und reifen Embryo". Blau fand es nur in der Schale (reifer Samen) und nur in den „beiden innersten direkt an das Endosperm grenzenden und mit diesem verwachsenen, tangential gestreckten Zellreihen (Pigmentschicht)". Nach eigenen Befunden enthält der reife Embryo Alkaloid (Fig. 73a). Übrigens ist die Meinung der Chemiker in dieser Frage ebenfalls geteilt. Während Hübler (1865), Kremel, Zeisel u. a. nur die Samenschale als alkaloidhaltig bezeichnen und Blau im isolierten Endosperm keine Spur von Alkaloid makrochemisch nachweisen konnte, finden andere Autoren auch im Endosperm Alkaloide; in der Arbeit von Blau wies Katz einen Rechenfehler nach.

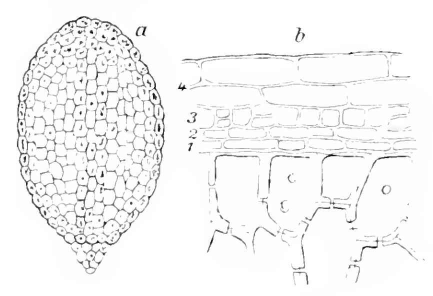


Fig. 73. Colchicum autumnale: *a)* isolierter Embryo, Alkaloidfällung (mit Jodjodkalium); *b)* Samenschale (fast reifer Same), die Schichten 1 und 2 führen die Hauptmengen Colchicin (Tunmann).

Fritillaria imperialis.

In den unterirdischen Teilen von Fritillaria imperialis entdeckte Fragner 1888 ein Alkaloid, Imperialin (bis 0,12 %), welches farblose Nadeln bildet, die sich in Alkohol und Chloroform leicht lösen, in Wasser aber unlöslich sind. Trotz der aufgestellten Formel sind wir über die Base noch wenig unterrichtet.

Die Mikrochemie bedarf noch weiterer Bearbeitung. Villani[1]) hat + und — Schnitte mit Jodjodkalium untersucht und fand die Base in der Wurzel vorzüglich im Pericambium und in der Endodermis, dann in der Epidermis und im Grundparenchym. Das Alkaloid soll in der Wurzel nur zum Teil im Zellsaft gelöst sein, zum Teil soll es besondere Körnchen bilden; in der Epidermis der Zwiebel soll es in Bläschen enthalten sein, die eine Haut besitzen, oft feinkörnig aussehen und in Wasser unlöslich sind. Es ist etwas gewagt, Körnchen und Bläschen deshalb als Alkaloide anzusprechen, weil sie sich in Weinsäure-Alkohol lösen.

[1]) A. Villani, Sulla localisazione dell' alcaloide nella Fritillaria imperialis, Malpighia, 1901, XV, S. 9.

Sabadilla officinarum.

Im Samen von Sabadilla officinarum Brandt wurden Alkaloide (Veratrin) 1818 von Meissner ermittelt. Das Veratrin der älteren Autoren war ein Gemisch mehrerer Basen. das jetzt im Handel befindliche besteht aus drei Alkaloiden (kristallisiertem Veratrin, amorphem Veratridin und Cevadin). Doch kommen noch mehrere, wenig erforschte Basen vor (Gesamtgehalt 0,6—0,7 %). Sie sind sämtlich an Veratrumsäure und Cevadinsäure gebunden.

Zum Nachweis der Alkaloide im Sabadillsamen lassen sich (Barth, S. 36 der auf S. 274 gen. Dissert.) eine große Anzahl Reagentien mit gutem Erfolg verwenden. Jodjodkalium, Kaliumwismutjodid (brauner Niederschlag), Pikrinsäure (gelber Niederschlag), Salzsäure (rote Färbung), Vanadin- und Selenschwefelsäure (braun — rot — violett), Schwefelsäure (grünblau — gelborange — rot), Salpetersäure (Gelbfärbung, bei Wasserzusatz nach einigen Stunden kristallinische Fällung), Kaliumquecksilberjodid (starke Fällung, nach Auswaschen des überschüssigen Reagens mit Wasser und nachfolgendem Schwefelsäure-Zusatz (2 : 1) entstehen in den Endospermzellen rote quadratische Kristalle, nicht in der Samenschale). Bei der Nachprüfung erwies sich diese Reaktion recht launenhaft, meist konnte ich aus unbekannten Gründen keine Kristalle erhalten. Die Fettmassen stören die Beobachtung. Bei der Salpetersäure-Reaktion fanden sich die feinen, lebhaft polarisierenden Kristalle fast ausschließlich in den Fettmassen (Fig. 74), so daß der Befund weiter verfolgt werden muß; die Natur dieser Kristalle erscheint noch nicht sicher gestellt. Zuweilen wird der ganze Tropfen kristallinisch. Bei durch Weinsäure-Alkohol alkaloidfrei gemachten Präparaten bleiben die genannten Reaktionen aus. — Die Mikrosublimation gibt, selbst bei Verarbeitung eines Samens auf einmal, keine diagnostisch brauchbaren Sublimate (nur spärliche kleinkörnige Substanzen).

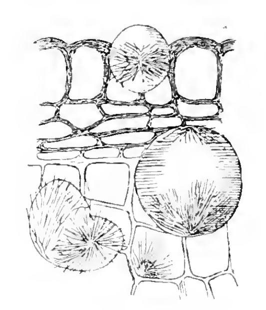


Fig. 74. Sabadilla officinarum (Same, Querschnitt). Kristalle (Alkaloide?) mit Salpetersäure-Wasser (Tunmann).

Die Alkaloide kommen ganz überwiegend im Endosperm und im Embryo vor. In der Samenschale treten weniger Alkaloide auf, immerhin deuten Kaliumquecksilberjodid und Jodjodkalium auch dort auf Alkaloide. Veratrin tritt nur im Endosperm und im Embryo auf.

Veratrum.

Veratrum album führt mehrere Basen (Protoveratrin, Jervin, Pseudojervin, Rubijervin, Salzberger)[1], die in geringerer Menge ebenfalls in Veratrum

[1] G. Salzberger, Arch. d. Pharm., 1890, CCXXVIII, S. 462.

viride auftreten und zum Teil in V. lobelianum und nigrum vorkommen. Sie werden von Veratridin, einer amorphen, noch wenig erforschten Base, begleitet, die sich mit konz. Salzsäure rot färbt. Im Rhizom von V. album gibt Kremel 1,3—1,5 %, Bredemann[1]) nur 0,199—0,932 % Gesamtalkaloid an.

Zum Nachweis zog Borscow[2]) verd. Schwefelsäure (1 Tropfen englische Schwefelsäure + 2 Tropfen Wasser) heran, welche die Alkaloide erst gelb, dann rotorange, schließlich schmutzig violettrot färbt. An dieser Färbung nehmen sämtliche Veratrumalkaloide teil. In neuerer Zeit hat Rundquist[3]) konz. Lösungen von Phosphorwolframsäure und Ammoniummolybdat benutzt, die gut sichtbare Niederschläge geben. Beim Nachweis minimer Mengen „empfiehlt es sich, die Schnittfläche der Präparate mit konz. Salzsäure zu befeuchten und schwach zu erwärmen, wodurch das Alkaloid lebhaft rot gefärbt wird“.

Borscow fand die Alkaloide in der Wurzel vornehmlich im Inhalte der Parenchymzellen, in einzelnen Zellen des Kambiforms, besonders aber in der Epidermis und in der Bündelscheide. Doch sollten nach ihm die Alkaloide, wenn auch in geringer Menge, ebenfalls in der Membran vorkommen, ein Irrtum, den Errera[4]) bereits richtig stellte und der leicht erfolgt, wenn man Säuren durchsaugt. Reaktionen werden von Errera nicht angegeben. Rundquist hingegen hält die Endodermis für alkaloidfrei und verlegt den Sitz in das stärkehaltige Parenchym. Größere Mengen führen die älteren Teile der Wurzel, während sich in jüngeren Teilen eine Abnahme bemerkbar macht und die Wurzelspitze ganz alkaloidfrei sein soll. Der Stengel zeigt die gleiche Lokalisation, führt aber weniger Alkaloid.

Amaryllidaceae.

Narcissus.

In Narcissus rugulosus, N. pseudonarcissus, N. incomparabilis, N. tazetta, N. poeticus treten wenig erforschte Alkaloide auf, die sich wahrscheinlich vom Pyridin ableiten. Gerrard fand 1877 in N. pseudonarcissus (Zwiebel) das Pseudonarcissin, de Wèvre[5]) untersuchte N. rugulosus, Yamanchi (1892) N.

---

[1]) G. Bredemann, Über die Alkaloide von Veratrum album und über die quantitative Bestimmung derselben, Apoth.-Ztg., 1906, XXI, S. 41.

[2]) El. Borscow, Über die Verbreitung einiger organischer Verbindungen in den Gewebselementen des Pflanzenkörpers, Bot. Ztg., 1874, XXXII, S. 38.

[3]) C. Rundquist, Über den Sitz und die Verteilung der Alkaloide in Veratrum album, Pharm. Post, 1901, XXXIV, S. 117.

[4]) L. Errera, in: Prem. rech. s. l. localisat. et signif. des alcaloides d. l. plant., Bruxelles, 1887, Sep. S. 24.

[5]) A. de Wèvre, Sur l'alcaloide des Narcisses, Bull. soc. belg. Microsc., 1886, XIII, S. 137.

tazetta (Blätter und Zwiebeln) und Ewins[1]) studierte das Narcissin näher, das sich leicht in Wasser, Alkohol und Essigsäure löst und brecherregend wirkt (Jourdain, 1872). Errera beobachtete nach Verdunkelung (2 Wochen) im Stengel keine Abnahme der Alkaloide.

Zum mikrochemischen Nachweis eignet sich am besten N. rugulosus und über diese Pflanze liegen Erfahrungen von Errera (S. 19 der auf S. 276 angef. Lit.) vor. Benutzt wurden zum Nachweis: Jodjodkalium (rotbrauner, in unterschwefligsaurem Natron sich lösender, körniger Niederschlag), Quecksilberkaliumjodid (weißliche, in Salzsäure unlösliche Fällung). Geringe, wenig auffallende Fällungen geben Tannin, Phosphormolybdänsäure, Pikrinsäure. Konzentrierte Schwefelsäure färbt die alkaloidhaltigen Zellen der Präparate lebenden Materials, die trocken unter Deckglas liegen, intensiv grünblau.

Alkaloidhaltig sind in der Wurzel: Endodermis und benachbartes Rindenparenchym, sowie zerstreute Zellen des Rindenparenchyms, das hypodermale Gewebe und die Geleitzellen der Siebröhren; im Stengel sind Alkaloide in den Raphidenzellen, in der Epidermis, in den Geleitzellen, in der Nähe der Gefäße und zuweilen in zentralen Zellen des Grundgewebes. Der Nachweis im Stengel ist schwierig, weil der Zellsaft bei der geringsten Verletzung austritt. Man muß die Präparate mit einem mit Jodjodkaliumlösung befeuchtetem Messer anfertigen, wodurch der Zellsaft sofort fixiert und an dem Austreten verhindert wird. — Interessant ist das Vorkommen der Alkaloide in den Raphidenzellen, ein Befund, der in neuester Zeit von Comotti[2]) bestätigt wurde.

Clivia.

Die Base von Clivia miniata Benth. (Cliviin) ist makrochemisch noch nicht studiert. Sie wurde von Molle[3]) bei mikrochemischen Studien aufgefunden. Zum Nachweis im ausgeflossenen Zellsaft dienen: Jodjodkalium (brauner N.), Kaliumquecksilberjodid (hellgelber, käsig zusammenballender N.), Phosphormolybdänsäure (gelber N., mit Ammoniak blau werdend), Goldchlorid (graugelber N., sich bald reduzierend), Tannin (weißer N.), konzentrierte Pikrinsäurelösung (gelbkörniger N., der sich in der Wärme löst und beim Erkalten wieder ausscheidet). Zum Nachweis in der Zelle sind am besten geeignet: Jodjodkalium, Goldchlorid (dieser Niederschlag kann nach der Strasburgerschen Methode für Aleuron-

---

[1]) A. J. Ewins, Narcissin, ein Alkaloid aus dem gemeinen Affodill (N. pseudonarcissus), Trans. Chem. Soc., 1910, XCVII, S. 2406.

[2]) R. Comotti, Unters. über die Lokalisation der Alkaloide in den Amaryllidaceen, Thèse, Paris 1910.

[3]) P. Molle, Un alcaloide dans Clivia miniata Benth., Rec. d. l'Inst. Errera, Bruxelles, 1906, VI, S. 57.

färbung — s. d. — für Dauerpräparate haltbar gemacht werden), Pikrinsäure. Schwefelsäure färbt mit Ammoniumvanadanat grün, mit Kaliumdichromat blau (zur Lokalisationsermittlung nicht geeignet). Die Lokalisation ist die gleiche wie bei Narcissus, stark alkaloidhaltig sind auch hier die Raphidenzellen.

Orchidaceae.

Die Orchideen-Alkaloide sind chemisch nicht näher erforscht. Wildeman[1]) suchte ihre Lokalisation mit Jodjodkalium an + und — Schnitten zu ermitteln: außerdem fanden Anwendung Phosphormolybdänsäure (gelber Niederschlag, besonders nach Zusatz einer Spur Salpetersäure). Froehdes Reagens (gelbe Färbung). Schwefelsäure (färbt die Alkaloidvakuolen gelb, die Reaktion gelingt nicht immer), Jodjodkalium, mit Ammoniumkarbonat versetzt, sowie Kaliumwismutjodid (braune Fällungen). Die Basen finden sich in den peripheren Teilen (Epidermis und Trichome), in meristematischen Geweben und im Parenchym der Luftwurzeln. Blätter und Blüten von Dendrobium nobile und Ainsworthii sowie in der Luftwurzel von Phalaenopsis Lüddemanniana. Aus D. nobile (Stengel) hat Clautriau ein Alkaloid isoliert, ein kristallinisches Sulfat. das ähnliche Reaktionen gibt, die naturgemäß stärker ausfallen. Die Raphidenzellen von Dendrobium sollen alkaloidfrei sein.

In ähnlicher Weise wies de Droog[2]) Alkaloide mikrochemisch nach in Eria stellata, Catasetum tabulare[3]), C. Hookeri, C. macrocarpum, C. discolor und C. Bungerothii. Von den Orchideen führen demnach nur die Catasetineen, Dendrobiineen und Sarcanthineen Alkaloide.

Dicotyledonen.

Piperaceae.

Piper.

Piperin (Oerstedt 1819), eine amidartige Verbindung von Piperidin und Piperinsäure, kristallisiert in farblosen, monoklinen Prismen, die sich schwer in Wasser, leicht in Alkohol (beim Erwärmen), Äther, Benzol, Chloroform lösen.

---

[1]) E. de Wildeman, Présence et localisation d'un alcaloide d. quelq. orchidées, Bull. soc. belg. microsc., 1892, XVIII, S. 101. Die Angabe der Literatur (Jahresber. d. Pharm. u. a.), daß W. Kristalloide (Eiweiß) als Alkaloidsalze angesprochen hat, ist falsch.

[2]) E. de Droog, Contr. à l'étude de la localisation microch. des alcal. dans la famille des orchidacées, Mém. Ac. royale de Belg., 1896, LV, Rec. Inst. bot., Bruxelles 1906, II, S. 347.

[3]) Die Alkaloide der Catasetum-Arten geben mit Goldchlorid farblose Sphärite.

Piperin kommt nur in Piperaceen vor, in den reifen und unreifen Früchten von P. nigrum (6—9, selten bis 13 %), in P. guineense Schum., P. lowong Blume (Stenhouse), P. Clusii (bis 5 %, Herlaut). Molisch (Histochemie, 1891, S. 29) betrachtete das Piperin infolge seines reichlichen Vorkommens als Reservestoff, der für die Pflanze eine ähnliche Bedeutung wie das Asparagin besitzt. Hiergegen spricht indessen der Befund, daß das Piperin nur im Sekret der Ölzellen lokalisiert ist, und daß Sekrete im allgemeinen keine plastischen Baustoffe enthalten.

Zum Piperinnachweis brachte Molisch die Präparate (P. nigrum) unter Deckglas in absoluten Alkohol und ließ nach dem teilweisen Verdunsten desselben Wasser zutreten. Hierbei entsteht zunächst eine milchige Trübung, die von harzigen Ausscheidungen herrührt; nach $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde scheiden sich nahe dem Deckglasrande Piperinkristalle ab. Piperinkristalle sollen auch in der gleichen Zeit entstehen, wenn man die Präparate unter dem Deckglas in Wasser zerdrückt und zerreibt und das Öl verdunsten läßt, sowie nach längerer Zeit (mehrere Stunden), wenn man zarte Schnitte in Wasser oder Glyzerin in der feuchten Kammer liegen läßt. Hierbei entstehen die Kristalle zuweilen (nicht immer) in den Ölzellen (Fig. 75b). Im Pfefferpulver des Handels trifft man ebenfalls Piperinkriställchen öfters an. Sehr schnell erhält man Kristalle bei Zusatz von Ammoniak (Fig. 75c). Der Literatur zufolge soll die Alkoholmethode bisweilen versagen. Mir gab sie stets schöne Erfolge. Doch ist es nötig das polarisierte Licht zur Auffindung zu benutzen. Die durch Alkohol abgeschiedenen Kristalle fand Zimmermann (Mikrotechnik, S. 121) vorwiegend in säbelförmiger Gestalt und einzeln liegend. Bei den Nachprüfungen wurden nur Kristallgruppen erhalten. Die größten, flachen Prismen waren bis 55 μ lang und 5—8 μ breit und stets eingefaßt von kleinen Kristallen (Fig. 75a). Die Piperinkristalle polarisieren lebhaft (vorwiegend in gelb) und zeigen eine unebene Oberfläche.

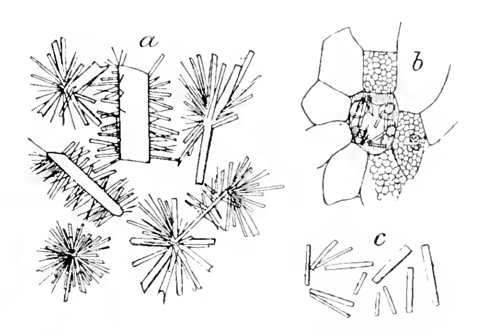


Fig. 75. Piper nigrum, Piperinkristalle, a) mit Alkohol aus dem Handelspulver erhalten, b) mit Glyzerin im Schnitte, c) mit Ammoniak im Pulver (Tunmann).

Man kann das Piperin auch mit Chloroform-Azeton zur Abscheidung bringen. Mehrere Präparate kommen unter Deckglas in Chloroform. Das verdunstende Chloroform wird einmal erneuert und das Deckglas hierbei gedrückt. Vor völliger Verdunstung des Chloroforms wird Azeton zugefügt; man läßt das Präparat über Nacht

liegen. Dem dann eingetrockneten Präparate wird Wasser oder Glyzerin zugefügt. Am Deckglasrande, doch über den Präparaten zeigen sich nun große und gut ausgebildete Prismen und Täfelchen, oft zu Drusen vereinigt. Bei der Mikrosublimation erhält man ebenfalls Piperinkristalle, doch keineswegs immer, wie Frank[1]) meint. Der beste und einfachste Nachweis ist entschieden mit der Alkoholmethode gegeben.

Die Piperinkristalle geben mit konzentrierter Chloralhydratlösung eine lebhaft gelbe Färbung, welche zunächst beständig ist, nach 24 Stunden aber in hellrot übergeht. Diese Reaktion soll nach Herlant[2]) weder den Harzen des Pfeffers noch dem Cubebin (S. 242) zukommen.

Charakteristisch sind einige Farbenreaktionen, die auch dem harzig-öligen Sekret zukommen. Konz. Schwefelsäure färbt sofort intensiv gelb, die Farbe geht schnell in rot über, wird dann purpurn, grünlich-gelb, schließlich braun. Salpetersäure färbt unter Gasentwicklung chromgelb bis orangefarben. Molybdän-Schwefelsäure rot, dann braun, Salzsäure gelb und rotbraun. Froehdes Reagens färbt, wie schon Molisch feststellte, das Sekret intensiv blau. Essigsäure löst den Inhalt der Sekretzellen.

Nymphaeaceae.

Das 1883 von Grüning im Rhizom von Nuphar luteum und Nymphaea alba entdeckte, amorphe Nupharin ist wenig erforscht. Pizzeti[3]), die vorzüglich Jodjodkalium zum Nachweis heranzog (Nuphar rotbraune, Nymphaea hellrote Färbung, die nach einiger Zeit schwindet), fand, daß die Lokalisation in beiden Pflanzen übereinstimmt. Alle Teile mit Ausnahme der Samen sind alkaloidhaltig. In den Blättern und Blüten finden sich die Basen in den epidermalen Geweben, in Achsen und Wurzeln im Parenchym. Die Lokalisation wechselt mit der Jahreszeit. Die Lokalisationsangaben sind recht unbestimmt gehalten. Die Arbeit sollte nachgeprüft werden. Die Nachprüfung müßte Erfolge haben, denn mit dem aus den frischen Rhizomen von Nuphar luteum isolierten Nupharin haben Goris und Crété[4]) mit Jodjodkalium einen braunen, mit Kaliumwismutjodid einen orangeroten, mit Kaliumquecksilberjodid einen weißlichen Niederschlag erhalten.

---

[1]) L. Frank, Praktische Anwendungen der Mikrosublimation, Ztschr. Nahr.- u. Genußm., 1903, VI, S. 880.

[2]) A. Herlant, L'analyse du poivre de Clusius, Bull. de l'Ac. roy. méd. de Belgique, 1894.

[3]) M Pizzeti, Sulla localisazione dell' alcaloide nel Nuphar luteum e nella Nymphaea alba, Malpighia 1904, XVIII, S. 106.

[4]) A. Goris et L. Crété, Sur la nupharine, Bull. scienc. pharm., 1910, XVII, S. 13.

Ranunculaceae.

Aconitum.

Die Akonitum-Arten enthalten eine Reihe wenig erforschter Alkaloide. Das Hauptalkaloid ist meist das Akonitin (Hesse u. Geiger, 1833). Die Handelsprodukte des Akonitins (deutsches, englisches, französisches) besitzen verschiedene Zusammensetzung. Noch weniger bekannt sind die Begleitalkaloide, Pikroakonitin, Napellin, Pseudoakonitin; letzteres soll in A. ferox das Hauptalkaloid sein. Andere Akonit-Arten (A. lycoctonum, A. heterophyllum) führen ähnliche Basen. Die Alkaloide, an Akonitsäure gebunden, finden sich in allen Organen der Pflanzen, reichlich in Knollen (A. paniculatum 0,9%), weniger in Blüten. Akonitin ist zu 0,3% aus dem Kraute, bis zu 0,6% aus den Knollen von A. napellus gewonnen worden, kommt in geringerer Menge in A. ferox, A. lycoctonum, A. variegatum, A. paniculatum, A. stoerkeanum u. a. vor. Nach Russel[1]) speichert sich Akonitin zur Winterszeit in der Wurzel an.

Clautriau (S. 16 der auf S. 276 gen. Lit.) fand zum Nachweis des Akonitins (Aconitum napellus) geeignet: Jodjodkalium (brauner Niederschlag), am besten nach Vorbehandlung mit Ammoniumkarbonat, Phosphormolybdänsäure, Kaliumquecksilberjodid und Tannin (sehr feine weißliche Fällung)), Phosphorsäure (violette Färbung), sowie Schwefelsäure, die mit 1/2–1/3 Volumen Wasser versetzt ist und die besonders nach vorausgegangenem Anfeuchten der Präparate mit Rohrzuckerlösung erst eine gelbe, dann eine karminrote Färbung bedingt. Diese Reaktion läßt sich auch mit getrocknetem Material ausführen, wenn man dasselbe durch Wasserdampf zuvor erweicht hat. Im Samen benutzte Barth (S. 36 der auf S. 274 gen. Diss.) außer den bereits genannten Reagentien noch die folgenden: Kaliumwismutjodid, Chlorzinkjod (dunkelbraune Fällung), Pikrinsäure, Bromwasser, Goldchlorid und Kaliumbichromat (gelber Niederschlag), ferner Vanadin- oder Cersulfatschwefelsäure (färben die Randpartien des Endosperms grüngelb, das Zentrum des Endosperms rot). Statt Phosphorsäure anzuwenden, kann man die Präparate in festes Phosphorsäureanhydrid einlegen und erwärmen: es tritt eine violette Farbenreaktion ein, die im Zentrum des Endosperms am stärksten ist. Zu erproben wäre Kieselwolframsäure, die H. Ribaut (Bull. scienc. pharm., 1910, XVII, S. 634) makrochemisch benutzt hat.

In Aconitum napellus finden sich die Alkaloide im Inhalt sämtlicher Zellen des Vegetationspunktes der Wurzel, dann im subepidermalen Gewebe (nicht in der Epidermis und in den Wurzelhaaren), sowie in der Umgebung der Bündel. Im Knollen ist Alkaloid in der

---

[1]) W. Russel, Sur le siège de quelques principes actifs des végétaux pendant le repos hivernal, Rev. gén. d. Bot., 1903, XV, S. 160.

Epidermis und im gesamten Parenchym, im Stengel: in der Nähe des Bastes, im subepidermalen Gewebe und um die austretenden Blattspurbündel, im Blatt: im ganzen Parenchym, besonders aber in den Schließzellen der Spaltöffnungen, in den Blumenblättern: in der Epidermis, in Staubgefäßen: vorwiegend in den basalen Teilen, nicht in den Antheren, im Fruchtknoten: in den Samenknospen. Im reifen Samen ist die Samenschale alkaloidfrei, hingegen führen Endosperm und Embryo Alkaloide. Wahrscheinlich sind im Zentrum des Endosperms mehr Alkaloide zugegen als in den peripheren Teilen.

Bei Aconitum lycoctonum benutzt Vanderlinden[1]) Jodjodkalium (brauner Niederschlag), Quecksilberkaliumjodid (gelb), Phosphormolybdänsäure (blaßgelb), Pikrinsäure (gelb). Lokalisation in der Wurzel: Bast, Kambium, Markperipherie, Endodermis, Pericykel; im Stengel: Mark, Kambium, Bast: im Blatt: nur im Bast des Blattstieles; in der Blüte: in allen Organen, aber nicht im Ovulum und in den Antheren.

Die Basen in Aconitum anthora werden nachgewiesen mit: Jodjodkalium (braun), Phosphormolybdänsäure (blaßgelb), Goldchlorid (grau, schwarz werdend), Pikrinsäure, Eisenchlorid (gelb). Lokalisation in Wurzel und Rhizom: Parenchym, besonders in der Peripherie nicht in Vegetationspunkten und Wurzelhaaren; im Stengel: in den Siebröhren und im gesamten Phloem sowie im peripheren Mark, nicht in Epidermis und in Trichomen; im Blatte: nur im Blattstiel in dem, dem Siebteil vorgelagerten Parenchym; in der Blüte: nur in den peripheren Geweben des Fruchtknotens, nicht im Ovulum (Vanderlinden). A. lycoctonum ist reicher an Alkaloid als A. anthora.

Bei Aconitum cammarum wies Theorin[2]) die Alkaloide mit Schwefelsäure (Violettfärbung) nach und findet sie im Stengel und im Knollen in der Umgebung der Bündel, ebenso in Blättern, die an heißen Sommertagen gepflückt waren.

Caltha palustris.

In Caltha palustris wurde von Johanson (Naturf. Ges. Dorpat, 1878, IV) ein Alkaloid von nikotinähnlicher Wirkung angegeben. Der mikrochemische Nachweis (Vanderlinden a. a. O.) wird erbracht mit Jodjodkalium, Pikrinsäure (gelbe Fällung), Eisenchlorid (graue Fäl-

[1]) E. Vanderlinden, Rech. microchim. s. l. présence des alcaloïdes et des glycosides dans la famille des renonculacées, Rec. Inst. bot. Bruxelles, 1902, V, S. 135.

[2]) G. Theorin, Einige pflanzenmikrochemische Notizen, Sv. Vet. Öfvers, 1885, Nr. V, S. 29.

lung), konz. Schwefelsäure (vorübergehend rot). An dünnen Schnitten parenchymatischer Gewebe liefert Goldchlorid-Ameisensäure gute Erfolge (s. Aleuronfärbung). Die frischen Schnitte werden mit destilliertem Wasser abgespült und vor Luft geschützt $1^{1}/_{2}$ Stunden in schwachem Goldchlorid mazeriert, dann abgewaschen und 2 Stunden im Lichte in $5\,^{0}/_{0}$ige Ameisensäure gebracht, schließlich folgt Glyzerin, Einschließen in Kanadabalsam. Der graue Niederschlag des Goldsalzes ist nun blauschwarz geworden.

Delphinium.

Im Samen von Delphinium staphisagria sind verschiedene Basen ermittelt worden, Delphinin (kristallinisch), Delphinoidin, Staphisagrin (amorph) und im frischen Samen Delphisin. Die chemische Kenntnis dieser Basen ist noch sehr lückenhaft.

Zum Nachweis benutzte Clautriau (Lit. S. 276, Sep. S. 16) Jodjodkalium, Phosphormolybdänsäure, Kaliumquecksilberjodid (Fällungen), Phosphorsäure (violette Färbung), verd. Schwefelsäure-Rohrzucker (gelb, karminrot): nach Vanderlinden fällt Pikrinsäure gelb, Tannin weiß. Nach den makrochemischen Befunden von O. Keller (Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 473) geben die Basen A und B aber nur mit Kaliumwismutjodid, Jodjodkalium, Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure noch bei 1 : 1000 Reaktionen, Base B auch mit Tannin; Pikrinsäure reagiert nicht. Bezeichnende Farbenreaktionen fehlen.

Bei Delphinium hybridum eignen sich zum Nachweis der Basen: Jodjodkalium und Kaliumquecksilberjodid (gelbbraun), Pikrinsäure, Goldchlorid (gelbe Fällung), Platinchlorid (schwacher, gelber Niederschlag). — Delphinium consolida ist arm an Alkaloid: Jodjodkalium (bräunlich), Kaliumquecksilberjodid (gelbgrau), Phosphormolybdänsäure (blaßgelb), Goldchlorid (grauschwarz), Eisenchlorid (grau), Pikrinsäure (gelb), Schwefelsäure mit Bromwasser (gelb, diese Reaktion soll dem Delphinin zukommen).

Bei den genannten Pflanzen sind die Basen überwiegend in gleicher Weise lokalisiert. Sie finden sich in der Wurzel: im Bast und im Parenchym; im Stengel und im Blatt: im Bast, Mark und in den peripheren Geweben.

Hydrastis canadensis.

Hydrastin, 1851 von Durand im Rhizom von Hydrastis canadensis L. aufgefunden (bis $2{,}5\,^{0}/_{0}$), kristallisiert in farblosen Prismen, die sich nur schwer in Wasser, leicht in Benzol, Chloroform und heißem Alkohol lösen. In der Pflanze kommt die Base teils frei, teils als Salz vor. Durch Oxydation (Platinchlorid, verdünnte Salpetersäure, Kaliumpermanganat in saurer Lösung) wird sie in Opian-

säure und Hydrastinin übergeführt. Letzteres bildet farblose Nadeln, welche sich leicht in Alkohol, Äther, Chloroform und heißem Wasser lösen. — Physiologische Angaben liegen nicht vor.

Hydrastin läßt sich nachweisen, indem man nach Tschirch (Anat. Atlas, 1900, S. 282) 2—3 Querschnitte im ausgehöhlten Objektträger mit Chloroform extrahiert und die Lösung verdunsten läßt. Der Rückstand „wird mit Schwefelsäure und Salpetersäure gelb, mit Chromatschwefelsäure bleibend rot bis braunrot, mit Ammonmolybdat-Schwefelsäure schmutziggrün, dann intensiv blau, mit Wismutnitrat und Schwefelsäure gelb, Bromwasser färbt gelblich, Chlorwasser läßt farblos". Bei den beiden letzten Reaktionen muß zuvor Schwefelsäure zugefügt werden. Schnitte, mit Chromatschwefelsäure behandelt, lassen rote Streifen abfließen, mit Ammoniummolybdat-Schwefelsäure werden sie schmutziggrün, dann blau. Grutterink[1]) empfiehlt den Chloroformauszug zu teilen und auf 2 Objektträgern abzudampfen. Der eine Rückstand wird mit etwas Wasser aufgenommen, mit Alkali versetzt, das Hydrastin heraussublimiert und im Sublimat mit Paranitrophenylpropiolsäure nachgewiesen (feine Kristallnadeln). In dem 2. Rückstand wird das Hydrastin als Hydrastinin nachgewiesen. Der Rückstand wird mit verdünnter Salzsäure aufgenommen, zur Trockne gebracht, mit einem kleinen Tropfen Ammoniak aufgenommen und abgedampft. Nun löst man diesen Rückstand in etwas Wasser und fügt Kaliumpermanganat zu. Es bilden sich sofort oder nach einiger Zeit violette Kristalle der Kaliumpermanganatverbindung des Hydrastinins. Nach Tunmann[2]) gelingt es, Hydrastin aus dem angefeuchteten Pulver direkt herauszusublimieren. Die zu zierlichen Sonnen angeordneten Stäbchen und Körnchen können durch Umkristallisieren in typische Hydrastinkristalle übergeführt werden. Befeuchtet man Pulver oder Schnitte mit einer Spur verd. Salzsäure (1 : 10), legt das Deckglas auf und fügt Chloroform zu, dann scheidet sich das Hydrastin schon während der Verdunstung des Chloroforms innerhalb weniger Minuten in rein weißen Prismen aus. Der Nachweis innerhalb der Zelle wurde von Herder[3]) zu erbringen versucht. Zur Anwendung gelangen Caesiumquecksilberjodid (in 30 %iger wässeriger Chloralhydratlösung, Empfindlichkeitsgrenze 1 : 2000), und Baryumquecksilberjodid (1 : 2400), welche einen amorphen Niederschlag geben, der an

[1]) A. Grutterink, Beiträge zur mikrochemischen Analyse einiger Alkaloide und Drogen, Dissertation, Rotterdam 1910, S. 78.

[2]) O. Tunmann, Beiträge zur Mikrochemie einiger Wurzeldrogen, Gehes Ber., 1912, S. 170.

[3]) M. Herder, Über einige neue allgemeine Alkaloidreagentien und deren mikrochemische Verwendung, Dissertation, Straßburg 1905, S. 38.

seiner weißen Färbung sich gut von den gleichzeitig entstehenden, gelben Berberinkristallen unterscheiden lassen soll. Nach eigener Erfahrung genügen die bisher bekannten Methoden zum Nachweis in der Zelle jedoch nicht. Mit einigem Vorbehalt läßt sich sagen, daß sich Hydrastin im Parenchym des Rhizoms gleichmäßig verteilt vorfindet und zwar in den gleichen Zellen wie Berberin und Canadin. In der Wurzel ist es nicht nachweisbar.

Nigella damascena.

Damascenin (Methylbetain der Methoxyanthranilsäure) wurde von Schneider 1889 in den Samen von Nigella damascena aufgefunden. Die Base bildet farblose, eigentümlich riechende Prismen, die sich in Alkohol, Äther, Petroläther und Chloroform mit blauer Fluoreszenz lösen, in Wasser aber unlöslich sind. O. Keller fand (1904 u. 1908) in Nigella damascena 0,5—0,6 % salzsaures Salz (nur Damascenin), in N. aristata 0,1 % (Damascenin und Methyldamascenin), während alle anderen Nigellasamen (sativa, arvensis, orientalis, hispanica, integrifolia, diversifolia, garidella) alkaloidfrei waren.

Nach Boelling[1]) geben die Alkaloidzellen von Nigella damascena (Samen) Niederschläge mit Pikrinsäure, Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure, Bromwasser und Kaliumkadmiumjodid, die sich aber über den ganzen Schnitt verteilen. Bessere Resultate liefern Joddämpfe, Jodjodkalium, Chlorzinkjod, Kaliumwismutjodid (rotbraune Niederschläge). Der grauweiße Niederschlag, den Kaliumquecksilberjodid erzeugt, läßt sich durch Schwefelwasserstoffwasser besser sichtbar machen. Goldchlorid erzeugt nach 2 Stunden kleine gelbe, im polarisierten Lichte aufleuchtende Kristalle. Während E. Schneider (Erlanger Dissert., 1889) den Sitz des Damascenins in die Samenschale verlegte, erhielt Boelling die oben genannten Reaktionen im ganzen Samen (also auch im Embryo und im Endosperm) mit Ausnahme der 2. und 4. Schicht der Testa. Während ferner die Chemiker nur ein Alkaloid angeben, gelangt Boelling zu dem Schluß, daß das Damascenin seinen Sitz nur in der Epidermis der Samenschale hat, daß aber im Samen „mindestens noch ein anderes Alkaloid (Nigellin, Connigellin?) in der 3. Schicht der Samenschale, im Endosperm und im Embryo enthalten ist“. Für diese Ansicht sprechen außer den erwähnten Reaktionen die Kristalle, welche verdünnte Mineralsäuren erzeugen. Durch verd. Schwefelsäure entstehen nach 2 Stunden in der Epidermis der Samenschale feine nadelförmige Kristalle, hingegen in der 3. Schicht der Testa, im Endosperm und im

[1]) G. Boelling, Beitr. z. Kenntnis einiger alkaloidhaltiger Pflanzen mit Berücksichtigung ihrer Anatomie und des mikrochem. Nachweises ihrer Alkaloide, Dissertation, Erlangen 1900, S. 53.

Embryo rhombenförmige Tafeln, durch verd. Salpetersäure in der Epidermis feine Nadeln, im übrigen Gewebe keine Kristalle, durch verd. Salzsäure farnkrautartig verzweigte Kristalle in der 3. Schicht der Testa, im Endosperm und Embryo. Die äußere Samenschale, getrennt mit Salpetersäure behandelt, gibt keine Kristalle. Diese Reaktionen bleiben bei alkaloidfreien Schnitten aus.

Sonderbarerweise hat Vanderlinden im reifen Samen von N. damascena kein Alkaloid nachweisen können. Darin sehe ich einen Beweis, daß es alkaloidfreie Arten (Kulturformen?) geben muß. Hingegen erhielt er in der Wurzel (ob von der gleichen Pflanze, ist nicht feststellbar) schwache Reaktionen im Kambium, Pericykel, Endodermis und in einigen Zellen des äußeren Rindenparenchyms (Jodjodkalium, Kaliumquecksilberjodid: Schwefelsäure färbt nicht). Die Pflanze scheint ein empfehlenswertes Objekt für Studien über die Individualität der Alkaloidpflanzen zu sein. —

In Ranunculus (lingua, repens, sceleratus, muricatus, acris, tuberosus, arvensis) hat Vanderlinden weder Alkaloide noch Glykoside (mit konz. Schwefelsäure) nachweisen können. Erfolglos waren ebenfalls die Untersuchungen von Clematis (vitalba, stans), Cimicifuga (americana, foetida), Ficaria (ranunculoides, calthaefolia), Thalictrum (adiantifolium, anemonoides), Eranthus hiemalis, Paeonia (officinalis, mollis), Anemone (japonica, nemorosa, pratensis, pulsatilla), Actaea spicata.

Berberidaceae.

Berberin.

Berberin (Hüttenschmidt 1824), eine quaternäre Base (Gadamer), aus Berberis vulgaris (Wurzelrinde) gewonnen, bildet gelbglänzende, bitter schmeckende Nadeln, die sich in heißem Wasser und Alkohol leicht, aber nicht in Äther und Schwefelkohlenstoff lösen. Berberin wurde früher für viele Familien angegeben (Berberideen, Ranunculaceen, Anonaceen, Menispermaceen, Papaveraceen, Leguminosen, Rutaceen). Gordin[1]) zeigte, daß Berberin in Jatrorrhiza palmata Miers[2]), Menispermum canadense L., Jeffersonia diphylla Pers., und in Radix pareirae bravae (Cissampelos?) fehlt. Bauer hat es ebenfalls in einer ganzen Anzahl Pflanzen, die man früher als berberinhaltig bezeichnete, nicht auffinden können. Berberin fand sich jedoch in Berberis aquifolium Pursh., B. fascicularis Sims., B. vulgaris L., B. cerasina Schrad., B. canadensis Pursh., B. lucida Schrad., ferner in Hydrastis canadensis L. (Wurzelstock), Coptis trifolia Salisb. (Stengel) und Xanthorrhiza

[1]) H. M. Gordin, Arch. d. Pharm., 1901, CCXXXIX, S. 638 und: Vorkommen und Nachweis des Berberins in Pflanzen, Arch. d. Pharm., 1902, CCXL, S. 146.

[2]) Da die Colombowurzel kein Berberin enthält, ist auf den mikrochemischen Nachweis des Berberins in dieser Droge von C. Rundquist nicht eingegangen; siehe hierüber S. 294.

apiifolia (Stengel). Die Blätter der Berberisarten sollen das Alkaloid nicht führen. Hingegen sollen nach Rosoll in der erwachsenen Pflanze bei Berberis vulgaris alle Organe mit Ausnahme der Blüte Berberin führen. Doch konnte ich in den Blättern im Juni kein Berberin nachweisen, auch nicht makrochemisch. Im Keimling kommt es in geringer Menge vor. Die größten Mengen finden sich an Orten mit regem Stoffwechsel.

Gelegentlich chemischer Studien hat sich bereits 1848 Boedeker[1]) mit dem mikrochemischen Nachweis des Berberins befaßt. Die Arbeit ist bemerkenswert, denn sie ist eine der ersten auf mikrochemischem Gebiete und wohl die erste, welche Alkaloide im pflanzlichen Gewebe zu ermitteln sucht. Er bediente sich der Salpetersäure und untersuchte Berberis vulgaris (und Menispermum palmatum, die aber kein Berberin führt). Naegeli und Schwendener[2]) fanden, daß der gelbe einge-



Fig. 76. Berberin. *a*) Berberis vulgaris. Tangentialschnitt aus dem Phloemparenchym der Rinde mit Kristallen von salzsaurem Berberin (mit 10% Salzsäure); *b*) Hydrastis canadensis, Libriformzellen der Droge mit eingetrockneten Ballen von Berberin; *c*) Kristalle von salpetersaurem Berberin aus Hydrastispulver; *d*) Kristalle der Jodverbindung (mit Alkohol-Jodjodkalium) (Tunmann).

trocknete wässerige Auszug der Rinde von Berberis vulgaris auf Zusatz von Salzsäure gelbe Nadeln von salzsaurem Berberin gibt, die meist strahlenförmig angeordnet sind. Herrmann[3]) legte die Schnitte zuerst auf dem Objektträger in etwas Alkohol. Bei nachfolgendem Zusatz von stark verdünnter Salpetersäure (2 : 100, Wasser) geht die goldgelbe Färbung in Braun über, und es scheiden sich alsbald goldgelbe stern- und büschelförmig verwachsene Nadeln von Berberinnitrat aus. Das Verfahren rührt, wie wir sahen, von Boedecker her (Fig. 76a). Wenig geeignet ist Schwefelammonium, das Herrmann ebenfalls empfiehlt und mit dem er eine braune Farbenreaktion er-

[1]) Boedeker, Ann. d. Chem. u. Pharm., 1848, LXVI, S. 384.

[2]) C. Naegeli u. S. Schwendener, D. Mikroskop, II. Aufl., 1877, S. 504.

[3]) O. Herrmann, Nachw. einiger organisch. Verbind. in den vegetabilischen Geweben, Dissertation Leipzig, 1876, S. 16.

hielt. Es ist bezeichnend, daß gerade bei der berberinfreien Jatrorrhiza palmata Schwefelammon die besseren Erfolge gab. Rosoll[1]) brachte Präparate von Berberis in Alkohol und setzte eine geringe Menge Jodjodkaliumlösung zu. Es bilden sich Kristalle, die in unterschwefligsaurem Natrium löslich sind. Sie sind haarförmig und von grüner Farbe. Bei Zusatz von größerer Quantität Jodjodkalium entstehen gelbe bis rotbraune Kristalle. Nach Tunmann[2]), der die Reaktion für brauchbar hält, zumal eine Blaufärbung der Stärke durch den Alkohol und die sofortige Bindung des Jods verhindert wird, entstehen aber beide Kristallformen (Fig. 76d) in den Präparaten nebeneinander, gleichgültig ob viel oder wenig Jod zugesetzt wurde. Gleichwohl hängen die Kristallformen von der Jodmenge ab, die wir aber schwer regulieren können, da sie bedingt wird von Strömungen und dem Eindringungsvermögen der Reagentien in die Zellen. Tschirch[3]) führt Farbenreaktionen aus; die Schnitte umgeben sich beim Behandeln mit Brom- oder Chlorwasser bei Zusatz von Schwefelsäure mit einer blutroten Zone; ferner weist er Berberin im Rhizom von Hydrastis canadensis nach, indem er aus den Präparaten mit Chloroform zunächst das Hydrastin (S. 288) entfernt. Die hydrastinfreien Präparate werden im ausgehöhlten Objektträger mit einigen Tropfen Wasser ausgezogen. Der wässerige Auszug wird eingedunstet. Der Rückstand wird nun mit Chromatschwefelsäure braun, mit Salpetersäure gelbrot, mit Wismutnitrat und Schwefelsäure violett bis braun. Chlorwasser oder Bromwasser färben nach vorangegangenem Zusatz von Schwefelsäure blutrot. Das Verfahren von Grutterink[4]) lehnt sich an diese Methode an. Das mit Chloroform ausgezogene (vom Hydrastin befreite) Hydrastispulver wird mit etwas Wasser extrahiert. Der wässerige Auszug zeigt beim Einengen bereits die Berberinkristalle; anderenfalls lassen sich solche durch Kaliumjodid oder Kaliumnitrat hervorrufen.

Kalziumquecksilberjodid und Baryumquecksilberjodid in 30% wässeriger Chloralhydratlösung gelöst wandte Herder[5]) an. Bei dem ersten Reagens ist die Empfindlichkeitsgrenze 1:65000, bei dem zweiten 1:80000. Untersucht wurden Rhizom und Wurzeln von

[1]) A. Rosoll, Über den mikrochem. Nachw. d. Glykoside und Alkaloide in d. vegetabil. Geweben, 25. Jahresber. d. Realgym. Stockerau, 1889/90, S. 20.

[2]) O. Tunmann, Beiträge zur Mikrochemie einiger Wurzeldrogen, Gehes Ber., 1912, Anhang, S. 178.

[3]) Tschirch-Oesterle, Anat. Atlas, 1900, S. 282.

[4]) A. Grutterink, Beitr. z. mikroch. Analyse, Berner Dissertation, Rotterdam 1910.

[5]) M. Herder, Über einige neue allgemeine Alkaloidreagentien und deren mikrochemische Verwendung, Dissertation Straßburg, 1905, S. 33.

Fibraurea chloroleuca und Hydrastis canadensis. Die Schnitte wurden in das Reagens direkt eingelegt und, bei, mit Kanadabalsam umrandetem Deckglase, einer 24stündigen Beobachtung unterworfen. Es entstanden bei Fibraurea gelbe drusenartige Berberinkristalle in den Sklerenchymfasern und in den Gefäßen. Hier findet es sich in den Wandungen. Im Parenchym trat es im Zellinhalte auf. Bei Hydrastis fand es sich „fast ausschließlich nur im Parenchymgewebe", „da das ganze Parenchymgewebe mit den gelben Kriställchen übersät war".

Eingehend hat sich ferner Bauer[1]) mit dem Berberinnachweis an einem größeren Pflanzenmaterial beschäftigt (s. oben) und die Azeton-Berberin-Methode benutzt. Längsschnitte durch das Rindenparenchym von Stengeln und Wurzeln werden auf dem Objektträger in einigen Tropfen Wasser einige Sekunden liegen gelassen (zur Lösung des Berberins); sodann wird ein Tropfen 10% Natronlauge und 4—5 Tropfen Azeton hinzugefügt, das Deckglas aufgelegt und vorsichtig erwärmt. Es entstehen Azeton-Berberin-Kristalle (grünlich glänzende Schüppchen). Bei Drogenmaterial ist nach Tunmann beim Nachweis mit Säuren ein vorheriges Einlegen der Schnitte auf kurze Zeit in verd. Alkohol zweckmäßig. Dämpfe von Ammoniak färben nur braun, von Salpetersäure bilden undeutlich kristallinische Massen. Beim direkten Eintragen lebender Zellen in Bromwasser bilden sich rötliche Fällungen, überwiegend im Inhalte der Zellen.

Über die Lokalisation des Berberins im Gewebe lauten die Angaben widersprechend. Bauer sagt, „daß Berberin nicht in allen Zellen der Pflanze gleichmäßig auftritt". Er schließt dies aus der verschieden langen Zeit, die bis zur Kristallbildung erforderlich ist. Allen genannten Methoden haftet der Mangel an, daß die Kristalle im Untersuchungstropfen oder über dem Präparate entstehen, wenigstens nicht scharf genug in den Zellen selbst. Nur Zimmermann[2]) sagt bei Nachprüfung des Salpetersäure-Verfahrens, daß sich das Berberinnitrat „im Innern der berberinhaltigen Zellen" abscheidet, was nicht ganz richtig (s. Fig. 76c), während Herrmann und Rosoll der Ansicht sind, daß es sich in dünnwandigen Zellen im Zellinhalt, in dickwandigen Zellen jedoch in der Membran findet. Dieser Meinung ist auch Herder: bei Fibraurea ist es im Holze in der Membran, im Parenchym dort und bei Hydrastis im Inhalte. Übrigens hat Boedeker schon 1848 die Anschauung vertreten, daß Berberin nur in der Membran auftritt. Bei vorsichtiger Präparation habe ich Berberin stets, auch in dickwandigen Elementen, nur im Zellinhalte in Form von Ballen angetroffen (Fig. 76b).

[1]) K. Bauer, Der mikroch. Nachweis des Berberins in Pflanzen und Drogen, Ztschr. d. öst. Apoth.-Ver., 1908 u. Jahresh. f. Pharm., 1908, S. 116.

[2]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechn., 1892, S. 118.

Epimedium.

In der Wurzel der Berberidee Epimedium alpinum fand Senft[1] im Auszuge und im äußeren Rindenparenchym starke Fällungen mit Jodjodkalium, Tanninlösung, Phosphorwolframsäure, Pikrinsäure, Phosphormolybdänsäure, Kaliumwismutjodid, Kaliumquecksilberjodid und Goldchlorid. Wenn die Reaktionen auch nicht für Berberin sprechen, so deuten sie doch auf ein Alkaloid. Nach Bauer (l. c.) fehlt Berberin in Epimedium.

Menispermaceae.

Jatrorrhiza palmata.

In der Wurzel von Jatrorrhiza palmata Miers (Radix Colombo) nahm man bis in die neueste Zeit Berberin an. Gadamer, sowie Günzel und Feist (Arch. d. Pharm., 1902, 1906, 1907) zeigten, daß drei Alkaloide vorkommen, die allerdings dem Berberin in chemischer Hinsicht sehr nahe stehen, Jatrorrhizin, Columbamin und Palmatin. Am reichlichsten findet sich Columbamin (in gelben warzenförmigen Drusen wahrscheinlich in Verbindung mit Salpetersäure und einem Bitterstoffe); in etwas geringerer Menge tritt Jatrorrhizin auf (in den Zellen als Chlorid, derbe orangerote Prismen bildend), während Palmatin sehr zurücktritt.

Die Columba-Alkaloide hat Rundquist[2]) mikrochemisch verfolgt. Nach dem damaligen Stande der Wissenschaft sollte außer Columbin noch Berberin, an Columbasäure gebunden, in der Wurzel zugegen sein. Zum Nachweis wurde Schwefelsäure benutzt, die in Xylem und Phloem Kristallbildung hervorruft: große prismatische sternförmig gruppierte Nadeln werden für Berberin angesprochen, kleine, einzeln liegende Säulen für Columbin. Später wurde gezeigt (Tunmann)[3]), daß hier Verwechslungen mit Kalziumsulfaten vorliegen, denn einmal finden sich Kalziumoxalate in Nadelform in der Nähe des Kambiums und außerdem ist die Mittellamelle sehr kalkreich, so daß durch die Säure weitere Gipskristalle entstehen. Im übrigen färbt Schwefelsäure, allein als auch in Verbindung mit Chlor- oder Bromwasser, rot. Nach Rundquist geben Pikrinsäure, Quecksilberchlorid, Kaliumdichromat, rotes Blutlaugensalz nur schwer sichtbare Niederschläge. Empfohlen wird hingegen zum Nachweis des vermeintlichen Berberins Ammoniumphosphormolybdanat, dessen Niederschlag sich in Ammoniak mit blauer Farbe löst und dadurch kenntlich wird. Die Schnitte werden nach der Molybdänbehandlung im Uhrgläschen gut ausgewaschen, um den

[1]) Em. Senft, Über Epimedium alpinum, Pharm. Praxis, 1901, I, Heft 7.

[2]) C. Rundquist, Mikrochemische Untersuchung der Radix Columbo, Schweiz. Wochenschr. f. Chem. u. Pharm., 1901, XXXIX, S. 280.

[3]) O. Tunmann, Über das Vorkommen von Kalziumoxalat in der Radix Columbo, Pharm. Centralhalle, 1906, XLVI, S. 1069.

Inhalt der angeschnittenen Zellen zu entfernen, und nachher mit Ammoniak behandelt. Der Niederschlag war „in den äußeren Teilen der sekundären Rinde, in dem zwischen den Baststrahlen liegenden Parenchym, das aus tangential etwas stärker gestreckten Zellen besteht", zugegen, nahm nach dem Kambium hin ab und trat im Holz „vorzugsweise in den älteren Gewebselementen der Markstrahlen" auf. Der Maximalgehalt wurde ermittelt, indem der Molybdanatniederschlag durch Schwefelwasserstoff in Sulfid übergeführt wurde und fand sich „ein Drittel des Wegs zwischen Zentrum und Kambium, von ersterem entfernt, in der Rinde dagegen relativ etwas näher dem Meristem" und soll makroskopisch durch die intensivere Gelbfärbung der betreffenden Region erkennbar sein. Diese Lokalisationsangabe bezieht sich nach Tunmann[1]) auf das Columbamin, welches mit Natriumjodid oder Kaliumjodid (1 : 20) hellgelbe amorphe Massen bildet, die die Zellumina erfüllen und nicht zur Kristallisation gelangen. Mit den gleichen Reagentien wird jedoch Jatrorrhizin in rötlichen kugligen Bildungen gefällt, die nach dem Austrocknen der Schnitte im Exsikkator sphärokristallinischen Aufbau zeigen und im polarisierten Lichte aufleuchten.

Jatrorrhizin ist ganz überwiegend im äußeren Rindenparenchym (in der Sklereidenzone) und in den Sklereiden selbst lokalisiert. Weiter nach innen zu nimmt der Jatrorrhizingehalt ab, um in der Nähe des Kambiums wieder anzusteigen. Die Alkaloide sind auch im Mikrosublimat, aber in nur undeutlich kristallinischer Form, zugegen. Palmatin gibt wie das Berberin eine Azetonverbindung (s. S. 293), die man mit Präparaten aber nicht erhält.

Anamirta paniculata.

Aus den Früchten (Kokkelskörner) hat Frank[2]) charakteristische Mikrosublimate erhalten. Ob die Kristalle der Sublimate die Basen (Menispermin) darstellen, welche in der Fruchtwand auftreten, bleibt noch zu untersuchen. Die größeren Kristalle gehören zum Teil Fettsäuren an. Auch Picrotoxin kann zugegen sein (reines Picrotoxin gibt bei der Sublimation aber nur flüssige Kristalle).

Papaveraceae.

Papaver.

Von den zahlreichen Alkaloiden, die im Opium, dem durch Anritzen der unreifen Kapseln gewonnenen, eingetrockneten Milchsafte von Papaver somniferum, aufgefunden sind, kommen in größerer Menge vor: Morphin (10—14 %), Narcotin

[1]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie der Colombowurzel, Apoth.-Ztg., 1912, XXVII, S. 268.

[2]) L. Frank, Praktische Anwendungen der Mikrosublimation. Ztschr. Nahr.- u. Genußm., 1903, VI, S. 880.

4—8%), Papaverin (bis 1%), Codein (0,2—0,8%), Thebain (0,2—0,5%), Narcein bis 0,4%). Die Menge des Milchsaftes und sein Alkaloidgehalt ist vom Klima nicht abhängig, denn in Schweden kann man ein ebenso gehaltreiches Opium gewinnen, wie in Kleinasien, China oder am Zambesi. Die Basen dienen der Pflanze zum Schutze, kommen ganz überwiegend, doch nicht ausschließlich, im Milchsafte vor.

Die erste Untersuchung über die Lokalisation der Alkaloide in Papaver somniferum rührt von Clautriau[1]) her. Der Milchsaft gab mit Jodjodkalium, Jodwismutjodkalium, Jodkadmiumjodkalium, Jodquecksilberjodkalium, Phosphormolybdänsäure Fällungen, wurde mit Titan-Schwefelsäure (Titansäure 2,0, Schwefels. 98,0) rotbraun, mit Methylal-Schwefelsäure (5 Tropfen Methylal auf 1 ccm konz. Schwefelsäure) violett: er enthält also Morphin. Da Palladiumchlorür und Iridiumchlorür ebenfalls mit dem Milchsaft Niederschläge geben, so wird die Anwesenheit von Narkotin wahrscheinlich, zumal sich der Milchsaft mit einer Lösung von selensaurem Natron in Schwefelsäure in gleicher Weise rotorange färbt, wie Gemische aus Morphin und Narkotin. Die bei Zusatz von Methylal-Schwefelsäure zunächst auftretende Gelbfärbung läßt auf die Anwesenheit von Narcein schließen.

Einen anderen Weg der Untersuchung, der allerdings nicht die Ermittelung der Lokalisation gestattet, wählte Kerbosch[2]). Die Alkaloide werden zunächst aus dem lufttrockenen Pflanzenpulver durch 3stündiges Schütteln mit der 5fachen Menge ammoniakalischer (pyridinfreies Ammoniak!) Chloroform-Alkohol-Mischung isoliert und gereinigt. Die Gesamtausschüttelungen werden vorsichtig eingedampft und der Rückstand mit 2 ccm 1% Salzsäure aufgenommen. In dieser Lösung werden nun die Hauptalkaloide mikrochemisch nachgewiesen und außerdem ihre Brechungsindices bestimmt. Aus saurer Lösung erfolgt bei Zusatz von Natriumazetat (gelinde Erwärmung) kristallinische Fällung von Narkotin. Der Lösungstropfen gelangt auf einen anderen Objektträger. Durch Erwärmen und Zusatz von Natriumazetat fällt zunächst der Rest von Narkotin aus, schließlich auch Papaverin. Eines der letzten Präparate wird mit einem Tropfen 1% Schwefelsäure mit Caesiumkadmiumjodid versetzt: es fällt die kristallinische Papaverinverbindung aus. In Lösung bleiben Narcein und Thebain. Der Tropfen wird mit Natriumazetat versetzt, der Objektträger bleibt 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur liegen. Narcein kristallisiert

[1]) G. Clautriau, Rech. microchimiques sur la localisation des alcaloides dans le Papaver somniferum, Ann. Soc. Belge de Micr., 1889, XII, S. 67.

[2]) M. Kerbosch, Bildung und Verbreitung einiger Alkaloide in Papaver somniferum L., Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 536.

aus (Blaufärbung mit Jod). Der abgezogene Lösungstropfen, mit Natriumkarbonat in geringem Überschuß versetzt und erwärmt, gibt kristallinisches Thebain. Mit Caesiumkadmiumjodid geben auch Kodein und Morphin charakteristische Kristalle, ersteres moosförmige Bildungen, letzteres sehr feine regellos angeordnete lange Nadeln. Außerdem eignet sich zur Unterscheidung von Kodein und Morphin die Reaktion mit Sublimat und Kaliumbromid nach Behrens[1]).

Die Opiumalkaloide sind nach Clautriau lokalisiert: im Milchsaft, in der Epidermis der ganzen Pflanze, hauptsächlich in der Epidermis der Kapsel, ferner in den Haaren des Kapselstieles, nicht in den Wurzelhaaren; nach der Basis der Pflanze hin macht sich eine Abnahme an Alkaloiden in der Epidermis des Stengels bemerkbar. Mit Hilfe der gereinigten Alkaloidauszüge der verschiedenen Pflanzenteile konnte Kerbosch (a. a. O.) ermitteln, daß der Same eine Spur Narkotin enthält, die beim Keimen sofort stark zunimmt, und amorphes Alkaloid. In der Keimpflanze entstehen nacheinander: Narkotin, Kodein, Morphin, Papaverin, Thebain. Die blühende Pflanze führt in allen Teilen (Staubfäden ausgenommen) bis zur Reife Narkotin, Papaverin, Kodein, Morphin. In den Blättern der Smyrnapflanze ist Narcein zugegen, das einheimischen Mohnsorten fehlt. Die reife Pflanze enthält in allen Organen Narkotin, Kodein, Morphin. Ersteres bildet sich im Samen auch beim Keimen im stickstofffreien Boden, entsteht aus Eiweiß und findet sich in der Blütenknospe in weit größerer Menge als in der unreifen Samenkapsel.

Sanguinaria.

In der Wurzel von Sanguinaria canadensis sind nach Kozniewski[2]) fünf Alkaloide: Protopin, β- und γ-Homochelidonin, die farblose Salze geben, ferner Sanguinarin, das überwiegend als glykosidischer Körper auftritt, welcher die rote Färbung hervorruft, und Chelerithrin, eine violette Base, die rote Salze liefert.

Mikrochemisch sind bei der Extraktion des Wurzelpulvers mit Schwefel- oder Petroläther, Schwefelkohlenstoff, Chloroform und Azeton Kristalle zu erhalten, die sich aber zur Charakterisierung nicht eignen sollen. In Schnitten rufen Schwefelsäure und jodhaltiger Schwefelkohlenstoff Bildung von Sphärokristallen und Nädelchen hervor.

---

[1]) H. Behrens, Mikrochemische Analyse organ. Verbindungen, Heft III, dort und bei F. Emich, Lehrbuch der Mikrochemie, S. 194, weitere Reaktionen, die mit reinen Opiumalkaloiden zu erhalten sind.

[2]) T. Kozniewski, Beiträge zur Kenntnis der Alkaloide aus den Wurzeln von Sanguinaria canadensis, Bull. Ac. de Cracovie, 1910, S. 235. Ref. Bot. Zentralbl., 1911, CXVI, S. 77.

Fumariaceae.

Zopf[1]) und Heinricher[2]) fanden in zahlreichen Fumariaceen idioblastische Elemente, die ersterer als „Gerbstoff- und Anthocyanbehälter" bezeichnete, während letzterer darauf hinwies, daß der Inhalt dieser Zellen (Schlauchzellen) mit Jodjodkalium oder alkoholischer Jodlösung einen braunen Niederschlag gibt, welcher sich ziemlich schnell wieder auflöst. Die Reaktion käme nicht einem „Gerbstoffe" zu. Léger (Compt. rend., 1890) spricht von Milchbehältern. Zopf[3]) selbst hat dann später erkannt, wenigstens bei Corydalis Arten, daß der Inhalt der Idioblasten mit Ammoniak (dunkelgrauer körniger N.), Pikrinsäure, Phosphormolybdänsäure (gelber N.) und mit Jodjodkalium (rotbrauner N.) reagiert. Niederschläge geben Goldchlorid, Platinchlorid, Kaliumdichromat. Eine nochmalige Prüfung unter Berücksichtigung der neueren makrochemischen Befunde ist erforderlich.

Cruciferae.

Brassia und Sinapis.

Sinapin, der leicht zersetzliche Cholinester der Sinapinsäure (Gadamer), findet sich als saures, schwefelsaures Salz im Samen von Brassica nigra und Turritis glabra, sowie in glykosidischer Bindung (Sinalbin) im Samen von Sinapis alba.

Molisch (Histochemie) schlug zum mikrochemischen Nachweis des Sinapins konz. Kalilauge vor: die Präparate werden gelb, beim Erwärmen chromgelb. Die Reaktion, die sich übrigens auch mit anderen Alkalien (Kalkwasser, Ammoniak) ausführen läßt, kommt auch dem Sinalbin zu, welches sich bei der Hydrolyse in Traubenzucker, Sinalbinsenföl und saures, schwefelsaures Sinapin spaltet.

Papilionaceae.

Cytisin.

Cytisin (Chevalier und Lassaigne 1818) bildet rhombisch-hemiedrische Kristalle, die sich leicht in Wasser, Alkohol, Chloroform, schwerer in Äther, Benzol, Azeton lösen. Die Salze kristallisieren leicht und werden mit Eisenchlorid blutrot. Das Alkaloid ist für Cytisus-, Genista-, Sophora-, Thermopsis-Arten typisch. Es findet sich in Laburnum vulgare, L. alpinum, Ulex europaeus,

[1]) W. Zopf, Über die Gerbstoff- und Anthocyanbehälter der Fumariaceen und einiger anderer Pflanzen, Biblioth. botan., 1886.

[2]) E. Heinricher, Vorläufige Mitteilung über die Schlauchzellen der Fumariaceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1887, V, S. 233.

[3]) W. Zopf, Zur physiologischen Bedeutung der Fumariaceen-Behälter, Ber. d. bot. Ges., 1891, IX, S. 115.

Baptisia tinctoria, B. australis, Sophora speciosa, S. tomentosa, S. secundiflora, Anagyris foetida, Euchresta Horsfieldii, Lotus suaveolens, Colutea orientalis. Plugge[1]) hat die bis 1895 als cytisinhaltig bekannten Pflanzen makrochemisch nachgeprüft und zusammengestellt. Reifer Samen von Laburnum vulgare hat 1,5, von Ulex europaeus nach Leprince und Monnier (1909) bis zu 2,55% Cytisin. Wijsman[2]) spricht das Cytisin für eine Substanz an, die sich an der Bildung der neuen Gewebe beteiligt, für eine Vorstufe der Eiweißkörper. Nach Guérin findet in der Kultur bei Lichtabschluß keine Abnahme statt.

Rosoll[3]) benutzte zum Nachweis des Cytisins im Gewebe nachstehende Reagentien: Jodjodkalium (bräunliche Färbung, schließlich rotbrauner Niederschlag, der sich in Natriumhyposulfit löst), Pikrinsäure (rotgelbe Kristallschuppen), Schwefelsäure (rötlichgelbe Streifen fließen ab, bei Zusatz eines Körnchen Kaliumdichromat wird die Lösung gelb, langsam braun, schließlich grün), Phosphormolybdänsäure (gelbe Trübung). Guérin[4]) bediente sich der gleichen Reagentien (mit Ausnahme der Schwefelsäure) und zog außerdem heran, Jodwismutjodkalium (rötlichbrauner N.), Jodquecksilberjodkalium (weißgelber N.), sowie Bromwasser (gelbe Fällung). In neuerer Zeit hat sich Boelling (S. 25 der auf S. 289 gen. Diss.) nochmals mit dem Cytisinnachweis beschäftigt und empfiehlt als Reagentien: Jodjodkalium und Chlorzinkjod (brauner amorpher N.), Kaliumwismutjodid (zinnoberrote Fällung), Phosphorwolframsäure, Kaliumkadmiumjodid, vor allem aber Goldchlorid (nach einigen Stunden sternförmige Kristalle, bei Nachprüfung nicht erhalten) und Salpetersäure in Dampfform (kleine rhombische Tafeln). Wijsman, der das Alkaloid vorzugsweise mit Jodjodkalium nachweist, ist der Ansicht, daß sich dasselbe nicht aus den Geweben mit Weinsäure-Alkohol entfernen läßt, und schließt aus diesem Verhalten, daß Cytisin im pflanzlichen Gewebe in verschiedener Weise gebunden sein muß.

Die Lokalisation während der Keimung verfolgte Boelling und bald darauf van Gulick[5]). Alkaloidhaltig sind: im Samen die Kotyledonarzellen und das Würzelchen, das ganze Gewebe des jungen Keim-

[1]) P. C. Plugge, Über das Vorkommen von Cytisin in verschiedenen Papilionaceen, Arch. d. Pharm., 1895, CCXXXIII, S. 430.

[2]) H. P. Wijsman, Über das physiologische Verhalten des Cytisins im Goldregen, Pharm. Weekbl., 1901, XXXVIII, Nr. 15.

[3]) A. Rosoll, Über d. mikrochem. Nachweis d. Glykos. u. Alkaloid in d. vegetab. Geweben, 25. Jahresber., Gymnas. Stockerau, 1889—90, S. 24 u. Bot. Centralbl., 1890, XLIV, S. 44.

[4]) P. Guérin, Rech. sur la localisation de l'anagyrine et de la cytisine, Bull. d. la Soc. bot. de France, 1895, XLII, S. 430.

[5]) H. van Gulick, De physiologische beteekenis van het alkaloid in den Goudenregen, Proefschrift, Leiden, 1901.

lings, Epidermis und primäre Rinde des Hypokotyls, die gleichen Gewebe des Stengels in älteren Pflänzchen und sämtliche Gewebe des jugendlichen Blattes. Diese Resultate stimmen im wesentlichen mit denen von Wijsman überein, der noch auf die Abnahme des Alkaloidgehaltes der Samen beim Keimen aufmerksam macht. Der junge Kelch und die noch geschlossene Blumenkrone sind alkaloidhaltig, die geöffnete Krone ist alkaloidfrei. Die Pollenmutterzelle führt Cytisin, das reife Pollenkorn nicht. In den erwachsenen Pflanzen finden sich die Basen vorzugsweise im Zellsaft der peripheren Gewebe. In der Achse ist Rindenparenchym und Phelloderm alkaloidreicher als das Mark. Kultivierte Arten sollen alkaloidreicher als wildwachsende sein.

Anagyrin.

Anagyrin (Hardy u. Gallois 1888, Partheil u. Spasski 1895) begleitet Cytisin in Anagyris foetida, bildet eine dickflüssige Masse, die sich leicht in Wasser, Chloroform und Alkohol löst und gut kristallierende Salze gibt. Es ist eine tertiäre, curareähnlich wirkende Base, die in salzsaurer Lösung von Quecksilberchlorid gefällt wird und so von Cytisin getrennt werden kann.

Anagyrin wies Guérin (a. a. O.) in gleicher Weise wie Cytisin nach (S. 299). Es ist im Samen und in vegetativen Teilen zugegen, in letzteren vorzüglich in peripheren Teilen, in den Blättern auch in den Trichomen; am gehaltreichsten ist die Wurzel.

Lupanin.

In den Lupinus-Arten kommen neben dem flüssigen Spartein verschiedene schwer kristallisierende Basen vor; die wichtigsten sind Lupanin (Nadeln, Samen von L. angustifolius 0,2—0,35 %, von L. perennis über 1 %) und Lupinin (rhombische Kristalle, Samen von L. luteus 0,5 %).

Da ein Nachweis der einzelnen Basen nicht möglich ist, so bleibt es noch fraglich, welche der Basen in erster Linie bei den mikrochemischen Reaktionen beteiligt ist. Während der Keimung verschwinden die Basen in Lupinus luteus aus den Kotyledonen (van Dyck)[1]. In der jungen Keimpflanze sind Epidermis und die Umgebung der Gefäßbündel alkaloidhaltig (Wurzel, Hypokotyl und Blatt), später auch das Rindenparenchym, das Mark und die Siebteile. Bei weiterer Entwicklung nehmen die Basen ab und sind schließlich nur in den Siebteilen anzutreffen. Jacquemin benutzte zum Nachweis die S. 304 angeführten Reagentien. Im Samen waren die Integumente (und die Samenschale) alkaloidfrei. Die Alkoloide fanden sich im Hypokotyl (Epidermis, Rindenparenchym, äußeres Mark, Spuren im Siebteil), im

[1] van Dyck, Phytochemische onderzoekingen over alkaloide in verband met het kiemen, Proefschr., Utrecht, 1900.

Blattstiel (Epidermis, zuweilen auch subepidermal, Siebteil, Mark), im Blatt (Epidermis, besonders unterseits, Nervenparenchym, Phloem, wahrscheinlich auch im Schwammparenchym), in allen Teilen der Blüte (vorzüglich in der Epidermis, weniger im Parenchym).

Ormosin.

Die Base Ormosin, welche noch recht wenig erforscht ist und von Merck aus dem Samen der brasilianischen Papilionacee Ormosia dasycarpa isoliert wurde, findet sich nach Boelling (S. 43 der auf S. 289 gen. Dissertat.) ebenfalls nur im Embryo. In den alkaloidhaltigen Zellen erzeugen Jodjodkalium, Chlorzinkjod, Kaliumwismutjodid rotbraune amorphe Niederschläge, Pikrinsäure, Gerbsäure, Bromwasser gelbe Fällungen, Kaliumkadmiumjodid, Kaliumplatincyanid weißliche Trübungen. Die hellgelbe Fällung, die Goldchlorid hervorruft, läßt sich durch Nachbehandlung der Schnitte mit Ferrosulfatlösung, die durch Kaliumquecksilberjodid entstehende gelbweiße Trübung durch Schwefelwasserstoffwasser besser sichtbar machen.

Physostigmin.

In den Samen von Physostigma venenosum Balf. ist Physostigmin, 0,1 %, das Hauptalkaloid (Jobst und Hesse 1864); andere Alkaloide sind wenig erforscht, das Calabarin Harnacks soll nach Ehrenberg (1894) nur ein Zersetzungsprodukt des Physostigmins sein. Reines Physostigmin löst sich schwer in kaltem Wasser, leicht in Alkohol, Äther, Chloroform. In welcher Form es in den Samen auftritt, ist nicht bekannt. Gerbstoff scheint zu fehlen. Nach Heckel (Lit. s. S. 263, 1), werden die Alkaloide beim Keimen der Samen verbraucht.

Der mikrochemische Nachweis hat mit dem großen Stärkegehalt zu rechnen. Barth (Lit. S. 274, 4) empfiehlt: Jodjodkalium (neben dem Jodamylum schwer erkennbarer brauner N.), Bromwasser (gelbbrauner N., besonders reichlich in den beiden äußersten stärkefreien Zelllagen der Kotyledonen), konz. Salpetersäure (schwache Gelbfärbung). Joddämpfe (gelbbraune Färbung neben der nur schwach gefärbten Stärke). Ammoniummolybdatschwefelsäure ist nicht zu verwerten, da sie auch an alkaloidfreien Präparaten Blaufärbung erzeugt.

Die bei der Mikrosublimation erzielten hellgelben Tropfen zeigen im polarisierten Lichte zuweilen kleine Kriställchen, die möglicherweise Physostigmin darstellen, denn die Sublimate geben Alkaloidreaktionen. Es gelang mir bisher nicht, das Alkaloid in kristallinischer Form als Salicylat zur Abscheidung zu bringen. Doch wären weitere Versuche in dieser Richtung wünschenswert.

Die Alkaloide finden sich im Samen (Barth) nur in den Kotyledonen, nicht in der Samenschale. Auch in der stärkefreien Plumula

und Radikula scheint Alkaloid zu fehlen. In der Keimpflanze (Jacquemin, Lit. S. 303, 1) sind in der Wurzel Spuren im Bast und in einigen Parenchymzellen, im Stengel Spuren im Bast und im Rindenparenchym; im Blatte sind sie im Schwammparenchym nahe dem Hauptnerven und in diesem selbst in einigen subepidermalen Zellen der Oberseite. Die grünen Kotyledonen sind alkaloidfrei.

Spartein.

Spartein, eine flüssige, dem Lupanin sehr nahestehende Base, 1851 von Stenhouse aus Cytisus scoparius dargestellt, ist noch wenig erforscht. Nach J. Chevalier (Compt. rend., 1910) nimmt der Sparteingehalt in der ersten Zeit zu, um zur Blütezeit und während der Fruchtbildung abzunehmen. In der Frucht häuft sich die Base in großen Mengen an (1 kg = 10 g Sparteinsulfat). Im Herbst findet eine, wenn auch geringere Zunahme wie im Frühling statt. 1 kg getrocknete Pflanzen führen 3,25 (April) bis 6,80 g (März) Sparteinsulfat.

Audemard[1]) verfolgte die Base in Spartium junceum, Sarothamnus scoparius, Genista purgans, G. tinctoria, G. scorpius, G. candicans, G. pilosa, G. andraeana, G. horrida. Der Nachweis wurde geführt mit Jodjodkalium (brauner N.), Kaliumquecksilberjodid, Sublimat, Phosphormolybdänsäure (weißlicher N.), Pikrinsäure (gelber N.), Bromwasser (ziegelroter N.), Selenschwefelsäure (rosa, dann rote F.); zu versuchen wäre Kieselwolframsäure, die Javillier (Bull. sc. pharm., 1910) makrochemisch benutzte. G. germanica, horrida, scorpius sind alkaloidfrei, G. candicans, Retama monosperma, Spartium junceum alkaloidarm. Die Samen sollen am wenigsten, die Wurzeln am meisten Alkaloid führen (in aufsteigender Linie: Samen, Stengel, Blatt, Blüte, Wurzel). Die Lokalisationsbefunde stimmen im allgemeinen mit den von Jacquemin (s. S. 303) angegebenen überein. Doch findet sich Alkaloid bei Spartium junceum (Blatt und Keimblatt) nicht nur in den Epidermen, sondern auch in den Palisaden.

Trigonellin.

Trigonellin, Methylbetain der Nikotinsäure (Jahns) kommt in den Samen und in etiolierten Keimpflänzchen verschiedener Leguminosen vor (Trigonella foenum graecum, Avena sativa, Pisum sativum), findet sich aber auch in anderen Familien, Mirabilis jalapa (Trier), Daucus carota, Wurzeln, Stachys, Knollen (Schulze), besonders in Samen (Strophanthus-Arten, Thoms), Cannabis sativa (E. Schulze) Coffea arabica (Polstorff), Coffea liberica (Gorter). Koffearin (Paladino)

[1]) A. Audemard, Recherches sur la localisation des alcaloides dans les Genêts, Thèse, Montpellier 1912 und Bull. d. Pharm. d. Sud-Est, 1903, S. 128

ist wahrscheinlich Trigonellin. Es bildet farblose, in Äther, Chloroform und Benzol unlösliche Prismen und findet in den Keimpflänzchen nach Schulze keine weitere Verwendung. Beim Samen von Trigonella foenum graecum wird die Mikrochemie von Tschirch (Anat. Atlas, S. 326) kurz berührt. „Auch das Trigonellin hat seinen Sitz in den Kotyledonen und der Radikula, denn beide werden durch Eisenchlorid rötlich und durch Kali gelb.“ Bei eigenen Versuchen, an dem gleichen Objekte ausgeführt, hatten Säuredämpfe, Pikrin-, Pikrolonsäure und Froehdes Reagens wenig Erfolg. Gold- und Platinchlorid geben amorphe Fällungen, die nach längerer Zeit kristallinisch wurden (Fig. 77), und sehr brauchbar war Quecksilberjodid-Jodkalium, besonders nach vorherigem Anfeuchten der Schnitte mit verd. Säure. Die Fällungen treten zumeist aus den Zellen heraus und wurden in allen Zellen des Keimlings erhalten. Die Reaktion mit Platinchlorid zeigt jedoch einen Maximalgehalt in den Palisaden an. — Schnitte geben die Reaktionen nicht.

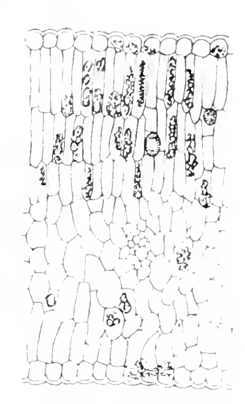


Fig. 77. Trigonella foenum graecum (Same, Querschnitt durch ein Keimblatt), Kristalle mit Platinchlorid - Salzsäure, Trigonellin (?) (Tunmann).

In einer größeren Anzahl Leguminosen hat Jacquemin[1]) die Alkaloide verfolgt. Die Alkaloide fanden sich vornehmlich in Epidermis, Parenchym und Mark; am meisten enthielten die Kotyledonen (Mesophyll und Epidermis, besonders der Oberseite) und die Vegetationsspitzen, dann die Epidermis und die subepidermalen Zellen des Hypokotyls (auch die Basalzellen der Trichome), die Epidermen der Blumenblätter; alkaloidreich sind Filament, Antheren, Stamina, Pistill; die Samenschalen sind alkaloidfrei. Die untersuchten Objekte, soweit sie nicht bereits eine Besprechung fanden, sind in umstehender Tabelle (S. 304) nebst den benutzten Reagentien zusammengestellt.

Erythroxylaceae.

Erythroxylon coca.

Aus Erythroxylon-Arten sind verschiedene Basen isoliert worden; Cocain (Hauptalkaloid, Gaedeke 1855, Niemann 1860, bildet 4—6seitige monokline Prismen), Tropa-, Methyl-, Cinnamylcocain, Benzoylecgonin, Hygrin, Cuskohygrin, α- und β-Truxillin. Der Gehalt an Gesamtalkaloid schwankt in den Blättern von

[1]) Alb. Jaquemin, Sur la localisation des alcaloides chez les Légumineuses, Rec. de l'Inst. Errera, Univ. Bruxelles, 1906, VI, S. 257.

	Jodjodkalium	Kalium-wismutjodid	Bromwasser	Sublimat	Phosphor-molybdänsäure	Pikrinsäure	Eisenchlorid	Kalium-quecksilberjodid
Pithecolobium Saman	körniger brauner N.	roter N.	rosa-gelbe F.	weißer N.	gelber N.	—	—	—
Sophora tomentosa	braun-roter N.	orangef. N.	gelbe F.	weißer N.	—	weißer N.	—	—
Anagyris foetida	braun-roter N.	rot-brauner N.	hell-gelbe F.	—	weiß-gelber N.	gelber N.	gelb-orange F.	weiß-gelber N.
Thermopsis fabacea	braun-roter N.	roter N.	—	weißer N.	—	weiß-gelber N.	braun-rote F.	—
Baptisia australis	braun-roter N.	rot-brauner N.	orange F.	weiß-gelber N.	gelber N.	gelber N.	violette F.	—
Erythrina viarum, E. insignis	braun-roter N.	orange- bis rot-brauner N.	gelbe F.	—	gelber N.	gelber N.	orangef. N.	—

E. coca von 0,607—1,06% (Hartwich, 1905); E. montanum führt 0,128%, E. retusum 0,167% (Eijkman, 1888). E. Ulei Schulze und E. subracemosum sind alkaloidfrei (Hartwich, 1909). Die Rinde führt bei E. coca 0,976, bei E. montanum 0,035, E. retusum 0,041%. Die Stengel von E. coca enthalten 0,38%, die Früchte 0,088—0,11%. Eingehende Studien über die Java-Kulturen verdanken wir de Jong (Teysmannia, 1906, XVIII, S. 120). Der Prozentgehalt ist in jugendlichen Blättern am höchsten, die absolute Menge nimmt langsam zu. Nach Tunmann und Jenzer, welche die Basen als Abbauprodukte auffassen (Verdunkelung, Abtrennen von Blatthälften), hatten je 1000 Blätter von E. coca (Berner Gewächshauspflanzen) folgenden Gesamtgehalt: 3 cm lg. = 0,120 g od. 1,454%, 5 cm lg. = 0,225 g od. 1,227%, 6—8 cm lg. = 0,386 g od. 0,808%. Die Samenalkaloide werden beim Keimen ausgelaugt. In den Keimpflänzchen erfolgt Neubildung (Fig. 78). Die Individualität im Alkaloidgehalt läßt sich bereits an $^1/_2$jährigen Topfpflanzen ermitteln (Tunmann, 1911).

Über den mikrochemischen Alkaloidnachweis gibt Tschirch[1]) an, daß man im Blattmesophyll durch Kalilauge in der Wärme „in einigen Zellen kleine nadelartige Kriställchen“ erhält, „die wohl Cocain sein dürften, das sich mit Kaliumquecksilberjodid oder Jodlösung nicht eben viel besser mikrochemisch nachweisen läßt“. Tunmann und Jenzer[2]) gebrauchten zum Nachweis: Jodjodkalium, Kaliumwismutjodid (kleine rotbraune Kristalle, auch Tröpfchen), Chlorzinkjod (große braune Tropfen), Brombromnatrium, Pikrinsäure (gelbe Niederschläge), Platinchlorid, Goldchlorid, Kaliumquecksilberjodid (gelbweiße, körnige Fällungen), Quecksilberchlorid, Überchlorsäure (weiße Körnchen), Kaliumpermanganat (1 : 100,0, violettrote Tropfen von gelapptem Umriß). Sämtliche Fällungen lösen sich bei längerem Liegen der Präparate im überschüssigen Reagens wieder auf. Fällungen kristallinischer Natur erhält man öfters, wenn man die Schnitte in einen kleinen Tropfen Platinchlorid (mit Salzsäure versetzt) einträgt, so daß die Schnitte gerade durchfeuchtet sind. Nach einigen Minuten werden sie in einen Tropfen Alkohol übertragen. Die Basen lassen sich aus den Präparaten lebender Pflanzen zum großen Teil mit Wasser ausziehen. Das Material muß in lebendem Zustande untersucht werden, die Präparate dürfen zuvor nicht längere Zeit im Wasser gelegen haben. Der Alkaloidgehalt ganzer Blätter, die in feuchter Kammer aufbewahrt waren, nahm über 50 % ab.



Fig. 78. Erythroxylon coca, Keimpflänzchen. In *a* und *b* mikrochemisch in Schnitten noch kein Alkaloid nachweisbar, erst in den Blättern von *c*. Bei *d* häufig auftretende Form der ersten Laubblätter (Tunmann).

Bei der Mikrosublimation des Pulvers oder der Schnitte erhält man Beschläge, die nicht charakteristisch sind, aber Alkaloidreaktionen geben. Nach 12—24 Stunden, oft erst nach längerer Zeit, kann man mit dem Polarisationsmikroskop feine Nädelchen wahrnehmen. Zuweilen findet man im Sublimat Benzoesäurekristalle.

Im Blatte sind die Alkaloide in der Epidermis beider Seiten und in einigen Mesophyllzellen, im Hauptnerv und Blattstielchen in der Epidermis, in subepidermalen Zellreihen, in den, den Markstrahlen vor-

[1]) A. Tschirch-Oesterle, Anatom. Atlas, 1900, S. 263.

[2]) O. Tunmann u. R. Jenzer, Pharm. Unters. über Pilocarpus und Erythroxylon Coca mit Berücksichtigung der Alkaloide, Verh. Naturf. Vers. Salzburg, 1909 (1910), II, 1, S. 114 und Schweiz. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1910, XLVIII, S. 17.

gelagerten Parenchymzellen und in zerstreuten Zellen des Markes und des Rindenparenchyms. Die alkaloidhaltigen Zellen bilden Zellzüge, die sich bei den Reaktionen scharf von dem völlig alkaloidfreien Nachbargewebe abheben. Die gleiche Lokalisation wie im Blattstiel sehen wir im Stengel und Blütenstiel. Kelch und Blumenblätter haben die Alkaloide in der Epidermis und im Nervenparenchym, während im Embryo und Endosperm geringe Spuren nachweisbar sind (doch nicht bei allen Früchten, da offenbar die Menge wechselt und an sich sehr gering ist).

Zygophyllaceae.

Peganum harmala.

Die kleinen Samen von Peganum harmala enthalten über 2% Harmalin (Goebel) und fast 2% Harmin (Fritzsche) und Harmol (O. Fischer). Harmalin bildet farblose rhombische Kristalle, die bitter schmecken, den Speichel gelb färben und in kaltem Wasser, Alkohol und Äther schwer löslich sind. Mit Säuren liefert es gut kristallisierende, gelb gefärbte Salze. In welcher Bindung die Alkaloide in der Pflanze auftreten, ist unbekannt.

Die Untersuchungen von Barth (Lit. S. 274, $_4$) haben ergeben, daß die Harmala-Alkaloide sehr leicht nachweisbar sind, da sie in großer Menge auftreten und gut kristallisierende Salze bilden. In den alkaloidhaltigen Zellen lassen sich Reaktionen erzielen mit: Jodreagentien (brauner kristallinischer Niederschlag, mit Chlorzinkjod haarförmige Kristalle), Platinchlorid, Goldchlorid (Kristalle), Kaliumbichromat (tafelförmige Kristalle), Salzsäure und Salpetersäure (in Substanz oder als Dampf angewandt, Kristalle), Pikrinsäure, Ferro- und Ferricyankalium, Rhodankalium, Natronlauge, Ammoniak (Bildung von Klumpen, deren Ränder zum Teil kleine Kriställchen zeigen), Bromwasser und Bromdämpfe (feine Kriställchen). An, mit Weinsäure-Alkohol alkaloidfrei gemachten Präparaten bleiben die Reaktionen aus.

Die Alkaloide finden sich nur in der Samenschale und zwar sind sie auf die innere großlumige Zellreihe beschränkt, welche der obliterierten Nährschicht, die das Endosperm bedeckt, außen anliegt.

Rutaceae.

Esenbeckia febrifuga.

In der Rinde von Esenbeckia febrifuga A. Juss. (Evodia f. St. Hil.) hatten Oberlin und Schlagdenhauffen[1]) ein Alkaloid ermittelt (Evodin). Hartwich und Gamper[2]) fanden 5 Alkaloide, das Haupt-

[1]) Oberlin u. Schlagdenhauffen, Et. histor. et chim. de different. écor. d. la famille des Diosmées, Nancy 1878.

[2]) C. Hartwich u. M. Gamper, Arch. d. Pharm., 1900, CCXXXVIII und: Gamper, Beitr. z. K. der Angosturarinden, Dissertat., Zürich 1900.

alkaloid ist das Esenbeckin. Es gibt so scharfe Reaktionen, daß es zur Diagnose des Pulvers der Rinde dienen kann, und wird nachgewiesen mit konz. Salpetersäure, die mit dem gleichen Teile Wasser verdünnt ist. Die alkaloidhaltigen Zellen werden grün, nach einiger Zeit rot bis rotbraun. Läßt man ferner auf die Präparate kurze Zeit wässerige Kaliumbichromatlösung einwirken, so erkennt man bei Zusatz von konz. Schwefelsäure bei gleichzeitiger Beobachtung die Alkaloidzellen an einer intensiven blaugrünen Färbung. Auch Jodsäure sowie Goldchlorid färben blaugrün. Die Alkaloide finden sich nur im Phelloderm und zwar bei innerer Peridermbildung ausschließlich im jüngsten Phelloderm. Die Alkaloide im älteren Phelloderm müssen sich inzwischen zersetzt haben, oder aber sie sind ausgewandert oder verbraucht.

Pilocarpus.

Von den Alkaloiden der Pilocarpussträucher, Isopilocarpin, Pilocarpidin Pilocarpin, ist letzteres, das Hauptalkaloid, am meisten erforscht; seine Konstitution ist noch unbekannt. Die Menge der in allen Teilen der Pflanze auftretenden Alkaloide schwankt bei den einzelnen Arten bedeutend. P. macrophyllus 0,84, P. spicatus 0,16, P. trachylobus 0,40, P. jaborandi 0,72 (Paul und Cownley, 1896), P. pennatifolius 0,40—0,50, P. microphyllus 1,48 % (Jenzer, 1910). Diese Werte beziehen sich auf Drogenmaterial (Blätter), bei dem eine Abnahme durch mangelhafte Aufbewahrung nicht ausgeschlossen ist. Bei einem freiwachsenden Pilocarpusstrauch (P. pennatifolius) in La Mortola wurden ermittelt: Blütenstielchen 0,51, Blütenknospen 0,44, Blütenachsen 0,27, Fiederblätter 0,24, Blattspindeln 0,23, jüngere Stengel (2jährig) 0,18 % (Tunmann und Jenzer, Lit. S. 305, 2). Während die Blätter dieses Strauches 1909 nur 0,224 %, 1910 0,223 % Gesamtalkaloid enthielten, ließen sich bei den Tochterpflanzen, die in Bern im Gewächshause gezogen waren, in den Blättern 3- bis 4mal so große Mengen nachweisen. Hierbei zeigten sich bei den einzelnen Individuen größere Differenzen, trotzdem sie unter gleichen Verhältnissen (Boden, Belichtung) in Kultur standen. Strauch I (Blatt) = 1,03, Strauch II = 0,70 %. Die Alkaloide wurden als Abbauprodukte angesprochen. Im Blatte erfolgt bei weiterem Wachstum eine Abnahme im Prozentgehalt, bei Berücksichtigung der absoluten Mengen läßt sich aber eine Vermehrung feststellen. 50 Blätter, 6 cm lg. = 0,0305 g od. 0,235 %. 12—16 cm lg. = 0,0621 g od. 0,200 % Alkaloid.

Zum mikrochemischen Nachweis zog Boelling[1]) Jodjodkalium, Kaliumwismutjodid, Chlorzinkjod, Pikrinsäure heran. Nach Tunmann[2])

[1]) G. Boelling, Beitr. z. Kenntn. einiger alkaloidhaltiger Pflanzen mit Berücksichtigung ihrer Anatomie u. des mikrochem. Nachweises ihrer Alkaloide, Dissertation, Erlangen 1900, S. 15.

[2]) O. Tunmann, Über den mikrochem. Alkaloidnachweis, speziell in den Blättern von Pilocarpus pennatifolius Lem., Schweiz. Wochenschrift f. Ch. u. Ph., 1909, XLVII, S. 177.

leisten gute Dienste Chlorzinkjod, Kaliumquecksilberjodid, Jodjodkalium und Kaliumwismutjodid (kleinkörnige Fällungen). Diese Reihenfolge entspricht der zunehmenden Empfindlichkeit der Reagentien. Zur Untersuchung ist lebendes Material zu verwenden, das vorher nicht gewässert haben darf. Die Niederschläge lösen sich in dem überschüssigen Reagens bald wieder auf; sie entstehen in den Vakuolen. Die Chromatophoren sind, entgegen der Ansicht von Elfstrand[1]), alkaloidfrei.

Die Lokalisation der Alkaloide im Blatte ist folgende: In fast allen Zellen der oberen Epidermis (Fig. 79), auch in den Deckzellen der Drüsen, in vielen Zellen der unteren Epidermis, in vereinzelten Mesophyllzellen, vorwiegend in solchen, die der unteren Epidermis anliegen. In den Nerven führen außer der Epidermis die subepidermalen Zellreihen, sowie einzelne Parenchymzellen Alkaloide, vornehmlich die den Markstrahlen der Bündel vorgelagerten Zellen und einzelne Zellen des Markes. Die Alkaloidzellen der Nerven bilden Zellzüge (Längsschnitte). Elfstrand und Boelling hielten die Epidermis für alkaloidfrei, ersterer hatte nur getrocknetes Material untersucht, letzterer wahrscheinlich keine Flächenschnitte, doch konnten Tunmann und Jenzer ihre mikrochemischen Befunde quantitativ begründen. Die obere Epidermis des freiwachsenden Strauches in La Mortola führte 0,51 %, die der Berner Gewächshauspflanzen 0,98 % Alkaloid. Die Lokalisation in Blattspindeln, Stengeln, Blütenstielen ist die gleiche wie im Blattnerven (Zellzüge in Mark und Parenchym, sowie Epidermis). Bei alkaloidarmen Pflanzen kann in der Stengelepidermis Abnahme der Alkaloide bis zum gänzlichen Schwinden stattfinden. Durch hohen Alkaloidgehalt sind Samenanlagen und Fruchtblätter ausgezeichnet. Die Pollenkörner sind in unreifem Zustande alkaloidhaltig, während die schizogenen Sekretbehälter, Oxalatzellen, mechanischen Elemente und Siebteile alkaloidfrei sind. In den dunkelvioletten Blumenblättern ist der Nachweis nicht zu erbringen.

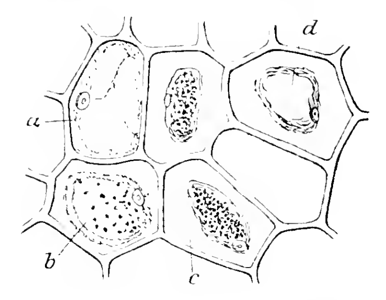


Fig. 79. Pilocarpus pennatifolius, obere Epidermis; *a*) lebende Zelle, *b*) bei Beginn der Einwirkung von Jodjodkalium, bei *c*) ist die Fällung vollendet, bei *d*) ist die Alkaloidfällung durch Auswaschen entfernt (Tunmann).

[1]) M. Elfstrand, Untersuchungen über brasilianische Drogen, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1897, VII, S. 290.

Aquifoliaceae, Sapindaceae, Sterculiaceae und Theaceae.

Coffein und Theobromin.

Coffein (Thein, Caffein, Methyltheobromin, Trimethylxanthin), 1820 von Runge entdeckt, 1897 von E. Fischer aus Harnsäure synthetisch hergestellt, bildet seidenglänzende Nadeln, die bei 234° schmelzen und sublimierbar sind; sie lösen sich unter Deckglas in heißem Wasser, Alkohol, Chloroform und Benzol. Theobromin (Dimethylxanthin), 1841 von Woskressensky entdeckt, ist im allgemeinen schwerer löslich als Coffein und bildet Nadeln, die ebenfalls ohne Zersetzung sublimieren. Theophyllin ist dem Theobromin isomer und kristallisiert in Tafeln. Während Theophyllin nur in Thea sinensis (Theaceae) vorkommt, tritt Coffein in Thea, der Rubiacee Coffea, den Sterculiaceen Theobroma cacao und Cola, der Sapindacee Paullinia cupana und der Aquifoliacee Ilex auf. Theobromin findet sich in Cola, Theobroma und Thea.

Aus dem reichhaltigen Analysenmaterial der Literatur können hier nur einige Zahlen mitgeteilt werden, die jedoch zur Vorstellung über die Verteilung der Basen in den einzelnen Organen der Pflanzen genügen. — Coffein (in Prozenten): Coffea liberica: junge Blätter 0,5—0,9, alte Blätter, Rinde, Holz, Wurzel koffeinfrei, junge Stengel 1,1, Perikarp und Integumente Spuren, unreife Samen 1,2. Coffea arabica: Früchte 1—1,3, Holz, Wurzel, Rinde, koffeinfrei oder doch nur Spuren, junge Blätter 1,42, alte Blätter 1,26, junge Stengel 0,6, alte grüne Stengel 0,2. Durch das Rösten der Kaffeebohnen wird der Coffeingehalt nicht vermindert, Rohkaffee 1,05—2,83, nach dem Rösten 1,09—2,95. Thea sinensis: Blütenteile 0,6—1,5, selbst 2,10, grüne Perikarpien 0,6, Samen Spuren — 0,1, jüngste Knospenblätter 3,4, ältere 1,5, junge Blätter 2—2,50, alte Blätter 1,5—1,8, Trichome junger Blätter 2,2, Wurzeln und Holz alkaloidfrei oder nur Spuren. Ilex paraguariensis: die Werte der einzelnen Handelssorten schwanken bedeutend, Paraguay ohne Stengel 1,37, mit Stengel 1,50, Brasilien 0,72. Paullinia cupana: Samen 4—6; Cola acuminata: Nüsse (Keimblätter) 2,5, junge Blätter 0,05; Theobroma cacao: Samen 0,2—0,3. — Theobromin: Theobroma cacao: Früchte 1—2,3, Samenkerne 1,5—1,9, Samenschalen 0,3—1,38. Cola: junge Blätter 0,1, alte Blätter alkaloidfrei, Nüsse 0,023—0,053.

Über die Art der Bindung der Xanthinbasen im Pflanzenkörper sind die Meinungen geteilt, jedenfalls ist diese bei den einzelnen Pflanzen verschieden. In der getrockneten Kaffeebohne soll Coffein an Chlorogensäure gebunden sein (Gorter), in den frischen tritt es vielleicht in freiem Zustande auf, in Colanüssen soll es mit Kolatin (einem Phenolkörper) in Bindung sein. Ob in Thea die Basen als Tannate vorliegen, wie vielfach angegeben, ist einwandfrei nicht erwiesen (Weevers)[1]. Theobromin tritt wahrscheinlich als Glykosid auf (Theobromin, Glukose und ein gerbstoffartiger Körper, Schweitzer). Über die physiologischen Aufgaben der Basen herrschen ebenfalls Widersprüche. O. Kellner u. a. betrachten sie als plastische Baustoffe, Heckel hält sie im Samen von Theobroma, Gaucher im Coffeasamen als Reservestoffe und nach Weevers werden sie bei

---

[1]) Th. Weevers, Bemerkungen über die physiologische Bedeutung des Coffeins, Ann. d. Jard. Bot. de Buitenzorg, 1910, 2, IX, S. 18.

der Eiweißassimilation gebildet, um später zur Eiweißsynthese wieder verbraucht zu werden. Anderseits werden die Basen von Clautriau, Suzuki, Hartwich und DuPasquier als Abbauprodukte angesprochen und in Parallele mit den Xanthinen tierischer Sekrete gebracht.

Der Nachweis der Purinbasen bei den verschiedenen Pflanzen in der Zelle selbst ist bisher in einwandfreier Weise noch nicht gelungen, zum Teil aus Mangel an geeignetem lebenden Material. Außerhalb der Zellen lassen sich Theobromin und Coffein bequem selbst mit kleinsten Schnitten nachweisen und zwar am besten mit Goldchlorid und mit der Sublimation.

Bei der einen der von Molisch[1]) angegebenen Methode wird das Alkaloid rein, bei der anderen als Goldverbindung abgeschieden. Man erwärmt einige Schnitte auf dem Objektträger in destilliertem Wasser, läßt bei Zimmertemperatur eintrocknen und fügt alsdann einige Tropfen Benzol zu. Beim Verdunsten scheiden sich die Alkaloide in farblosen Nadeln aus. Auffallendere Resultate liefert die andere Reaktion. Man trägt einige Schnitte direkt in einen Tropfen konzentrierter Salzsäure ein, setzt nach 1—2 Minuten am Deckglasrande 3⁰/₀ige Goldchloridlösung zu. Beim Eintrocknen scheiden sich vom Rande des Lösungstropfens her sehr lange gelbe spitze Nadeln aus, die zu strauch- und baumartigen Gebilden vereinigt sind (Fig. 80d). Es ist vorteilhafter, eine mit Säure versetzte Goldchloridlösung zu benutzen. Bei Anwendung einer stärkeren Goldchloridlösung (als 3⁰/₀) verursacht Salzsäure allein bereits Kristallbildung[2]). Verwechslungen zwischen den Kristallen der Reagenslösung und dem Goldsalz der Basen sind nicht ausgeschlossen. Die Doppelsalze entstehen in den Sublimaten (s. unten) sofort, man kann ihr Wachstum mikroskopisch verfolgen; sie sind von gelber Farbe und fast stets an den Enden zugespitzt. Die Reagensausscheidungen, die Salzsäure allein bewirkt, erscheinen im allgemeinen nach längerer Zeit, ihre Bildung hängt zum Teil von der Menge und Stärke der Salzsäure ab. Es erscheinen der Reihe nach farblose Würfel, schmale, farblose Stäbchen und Platten, sowie starke, gelbe Prismen (Fig. 80e).

Am bequemsten wird der Nachweis durch Sublimation erbracht. Die Sublimierbarkeit der Purinbasen ist schon lange bekannt. Bereits

[1]) H. Molisch, Grundriß einer Histochemie der pflanzlichen Genußmittel, Jena 1891, S. 15.

[2]) T. F. Hanausek, Zur histochemischen Koffeinreaktion, Ztschr. d. allg. österr. Apoth.-Ver., 1891, XXXV, S. 606; ferner: L. Cador, Untersuchung der Maté-Blätter unter Berücksichtigung ihres Gehaltes an Thein, Bot. Centralbl., LXXXIV, S. 251.

Stenhouse und Heynsius[1]) wußten, daß man Koffein aus Drogen durch Sublimation erhalten kann. Waddington[2]) berichtet ebenfalls hierüber. Behrens[3]) benutzte die Sublimation zwischen Objektträgern, glaubte aber die Alkaloide zuerst isolieren zu müssen. Das gepulverte Material wurde mit etwas gebranntem Kalk unter Zusatz von Wasser auf dem Objektträger gemengt. Dann ließ man die Masse eintrocknen, zog sie mit Alkohol aus und sublimierte den Rückstand des Auszuges. Derart arbeiteten Th. und C. J. Weevers[4]) bei ihren physiologischen Untersuchungen. Doch erst durch die direkte Sublimation der pflanzlichen Objekte kam die Methode allgemein in Aufnahme. Nestler[5]) führte sie in mehreren Arbeiten an sämtlichen purinhaltigen Pflanzen aus und benutzte zur Sublimation die in Fig. 7, S. 24 angegebene An-

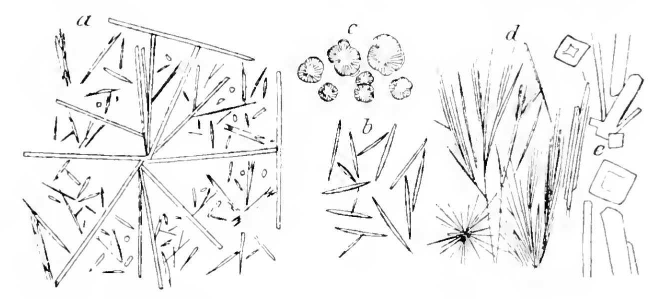


Fig. 80. Nachweis der Purinbasen. *a*) Sublimat von Cola acuminata (Kotyledonen), Coffeinkristalle. Theobroma cacao *b*) Theobrominkristalle im Sublimat, *c*) Coffeinsilbernitrat, *d*) Golddoppelsalz des Coffeins, *e*) Kristallausscheidungen im Goldchlorid auf Zusatz von Salzsäure (Tunmann).

ordnung. Gleichzeitig wurde auch von anderer Seite die direkte Sublimation aufgenommen[6]). Es gelang aber mit der Sublimation nicht

[1]) H. Heynsius, Journ. prakt. Chem., 1850, XLIX, S. 317.

[2]) H. J. Waddington, On microsublimation, Pharm. Journ. and Transact., 1867, 2, IX, S. 409.

[3]) H. Behrens Mikroch. Analys., 1899.

[4]) Th. Weevers, und C. J. Weevers de Graaff, Onderzoekingen over eenige xanthine-derivaten in verband met de stofwisseling der plant, Ak. d. Wetenschapp., Amsterdam. 1903, XII, S. 369.

[5]) A. Nestler, Ein einfaches Verfahren des Nachweises von Thein und seine praktische Anwendung, Ztschr. f. Nahr. u. Genußm., 1901, IV, S. 289. — Über den direkten Nachweis des Cumarins und Theins durch Sublimation, Ber. deutsch. bot. Ges., 1901, XIX, S. 350. — Nachweis von extrahiertem Tee durch Sublimation, Ztschr. f. Nahr.- u. Genußm., 1902, V, S. 245. — Praktische Anwendung der Sublimation, ibid., 1903, VI, S. 408.

[6]) P. Kley, Mikroch. Unters. des Tees und einige Beobachtungen über das Coffein, Rec. trav. chim. Pays-Bas., 1901, V, S. 344. — Ph. Vadam, Bull. d.

Theobromin von Coffein zu trennen und bei nicht entfetteten Samen (Cacao, Thea) wurden keine Kristalle erzielt, sondern erst mit den Auszügen (Nestler, DuPasquier). Beides läßt sich mit der Sublimation auf der Asbestplatte erreichen (S. 25), die ein rasches, starkes Erhitzen ermöglicht, so daß die mitsublimierenden Fettsäuren die Kristallisation der Purinbasen nicht hindern, wir erhalten dann (Fig. 80a, b) „anfangs feine, lange Nadeln (Coffein) später derbe, kurze Kristalle (Theobromin)" (Tunmann, Nat.-Vers. Karlsruhe 1911). Theobromin, das erst bei höherer Temperatur übergeht, sich demnach in den zuletzt abgehobenen Sublimaten findet, ist kristallographisch bereits daran zu erkennen, daß es niemals lange Nadeln bildet. Die mittleren Sublimate enthalten natürlich Gemische beider Basen. Während die ersten Sublimate in Tetrachlorkohlenstoff löslich sind (Coffein), sind die letzten Beschläge darin unlöslich (Theobromin). Die Coffeinkristalle verschwinden bei Zusatz von wenig Chloroform sofort, während Theobromin schwer löslich ist. Diese Lösungsunterschiede genügen zur Diagnose. Die Goldsalze sind kaum zu unterscheiden. Zur Charakteristik der allerersten Sublimate, die unter Umständen einmal pulverig ausfallen können, und zur Differentialdiagnose dient Silbernitrat (Fig. 80c). Ein Zusatz von verdünnter Salpetersäure, den Behrens vorschreibt, und der recht vorsichtig in einer Spur bemessen sein muß, ist nicht unbedingt erforderlich. Man durchstreicht das Sublimat mit wenig Silbernitrat; in kurzer Zeit schießen an den Strichgrenzen zierliche sphärokristallinische Gebilde an (Coffein) oder kurze Nadeln in Büschel oder einzeln liegend (Theobromin).

Den oben angeführten Methoden stehen alle anderen Reaktionen an Brauchbarkeit bedeutend nach. Einige der Reaktionen, die makrochemisch gute Resultate liefern, haben sich bei der Nachprüfung als unbrauchbar erwiesen. In Schnitten wird man von einer Reaktion mit Silbernitrat am besten ganz absehen. Silbernitrat ist bei gerbstoffhaltigem Material viel zu empfindlich. Zersetzungen können nicht nur durch noch nicht bekannte Substanzen der Schnitte, sondern auch durch das Präparieren (Licht, Metall) hervorgerufen werden. Auch Quecksilbersalze, die der Literatur[1] nach mikrochemisch schon brauchbare Resultate geliefert

scienc. pharmacolog., 1900, II, S. 98. — G. L. Spencer, Rev. inter. fals., X, S. 15. — L. Frank, Praktische Anwendungen der Mikrosublimation, Ztschr. Nahr.- u. Genußm., 1903, VI, S. 880. — Die in neuester Zeit ausgearbeitete quantitative Bestimmung von Burmann, die von gereinigten Pflanzenauszügen ausgeht, fußt ebenfalls auf Sublimation (J. Burmann, Schw. Wochenschr. f. Chem. u. Pharm., 1910, XLVIII, S. 448, vergl. m. Ref. in Bot. Centralbl., 1911, CXVI, S. 174).

[1]) A. Tschirch u. Oesterle, Anatomischer Atlas, 1900, S. 70.

haben, sind nicht zu empfehlen. Die Doppelverbindung mit Quecksilberchlorid, die bei Anwendung einer reinen Coffeinlösung aus langen Nadeln besteht, fällt bei Benutzung von Schnitten ganz unklar aus. Nur selten erhält man kleine Körnchen oder Täfelchen, oft nur braune Massen, niemals lange Nadeln. Unsicher ist ferner der Erfolg mit Jodjodkalium bei Gegenwart von verd. Schwefelsäure, wie auch Hartwich und DuPasquier[1]) bei den Teeblättern fanden. Das Eintreten der Reaktion (violetter Niederschlag) scheint wesentlich von dem richtigen Zusatz der Schwefelsäure abzuhängen. Bei stärkehaltigen Objekten ist die Reaktion ohnehin wenig geeignet. Die Murexidreaktion gelingt ebenfalls nicht, nach Clautriau[2]) selbst dann nicht, wenn man dünne Schnitte mit Coffeinkristallen versetzt. Die von Schaer[3]) für makrochemische Zwecke angegebene Methode ist für uns wenig brauchbar. Hierbei werden die Präparate mit Perhydrol-Salzsäure (Perhydrol 1 Vol., Salzsäure 9 Vol.) erhitzt, die Flüssigkeit wird verdampft, der blaßrote Rückstand gibt mit Ammoniak eine purpurrote Färbung. Doch ist die Anwendung sehr starker Präparate nötig und selbst diese werden stets weitgehend zerstört.

In Coffea arabica wies Coffein im Gewebe Gaucher[4]) mit einer gesättigten Lösung von Ammoniummolybdat und Chlorammonium nach, welche mit Coffein einen weißen Niederschlag gibt, der sich beim Erwärmen löst und bald blaue Färbung annimmt. Es ließ sich außerdem eine wässerige Lösung von Ammonium vanadinicum (1 : 40) benutzen, die mit Coffein in salzsaurer Lösung eine geringe Trübung verursacht, aus der beim Verdunsten ein roter Rückstand entsteht. Gewächshauspflanzen zeigten Coffein im Mesophyll und im Embryo des Samens. Junge Pflänzchen, die noch kein Chlorophyll aufwiesen, waren alkaloidfrei. Die Sublimation benutzte Hartwich[5]) bei einer Anzahl Samen. Positiv fiel der Nachweis bei nachstehenden Arten aus: Coffea excelsa Chevalier, C. mauritiana Lam., C. canephora Pierre und var. kouillonensis Pierre, C. bukobensis, C. monticala, C. Ibo Froehner, C. mexicana D. C., C. Dubouxii, C. robusta: unsicher war die Reaktion bei:

[1]) P. A. DuPasquier, Beiträge z. Kenntnis des Tees, Dissertation Zürich 1908, C. Hartwich u. A. DuPasquier, Apoth.-Ztg., 1908, XXIII, Sep.

[2]) G. Clautriau, Nature et signification des alcaloides végétaux, Rec. de l'Inst. bot. de Bruxelles, 1902, V, S. 35.

[3]) E. Schaer, Über Alkaloid-Reaktionen mit Perhydrol, Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 458.

[4]) Gaucher, Mikrochemischer Nachweis von Coffein, Rép. de Pharm., 1895, S. 341, und: De la caféine et de l'acide cafétannique dans le caféier (Coffea arabica L.). Rech. microscopiques, Montpellier, 1895.

[5]) C. Hartwich, Die menschlichen Genußmittel, Leipzig 1910, S. 825.

C. Gallieni Dubard und C. Humblotiana Baill., negativ bei O. Bonnieri Dubard. Letztere, sowie die Samen von C. Humblotiana, C. Gallien. und C. Mogneti hatte schon vorher Bertrand für koffeinfrei erklärt[1]). Auch junge und alte Kaffeeblätter geben deutliche Sublimate (Nestler).

Bei Cola (Kotyledonen) scheint es nach Tschirch (Anat. Atlas, S. 350), daß „gewisse Zellen reicher an Coffeintannat sind als andere", denn beim Einlegen frischer Schnitte in Osmiumsäure färben sich regellos zerstreute Zellen des Grundgewebes tiefer als die übrigen. „Erwärmt man einen Schnitt mit einem Tropfen Kalilauge und läßt nach Beiseiteschieben des Schnittes eintrocknen, so kristallisieren feine isolierte Nädelchen von Coffein aus." Weevers (Lit. S. 311, 4) haben in jungen Blättern Theobromin festgestellt, alte Blätter führen keine Alkaloide. Die Sublimation hat Nestler auch zum Nachweis der Basen in Kolapräparaten herangezogen.

In Thea bemühte sich DuPasquier die Basen in der Zelle nachzuweisen, indem er Mikrotomschnitte frischen Materials (Blattschnitte von 20 μ Dicke) solange mit Wasser auswusch (15—20 Minuten), bis das Waschwasser nicht mehr mit Eisenchlorid reagierte, bis aller freier Gerbstoff entfernt war. Dann kamen die Schnitte in ein Gemisch von Salzsäure und Goldchlorid; ein gelbbrauner Niederschlag zeigte Coffein an. Gleich dicke nicht gewässerte Schnitte zeigten den Niederschlag, jedoch weit stärker, an der gleichen Stelle. Kristalle waren nicht entstanden. Weevers hat gegen die Methode an sich Einwand erhoben, die Ergebnisse dürften aber zu recht bestehen. Im Blatte finden sich die Basen: in den Palisaden und im Schwammparenchym: im Mittelnerv: in den Markstrahlen, in vereinzelten Zellen des Phloems und im subepidermalen Collenchym; wahrscheinlich in Spuren auch in den Schließzellen. Im Stengel versagte die Methode. Der Gerbstoff ließ sich von den Basen nicht durch Auswaschen der Schnitte trennen. Ohne Auswaschen trat die Reaktion ein im Rindenparenchym, sehr schwach in den Markstrahlen des Holzes. Ähnlich verhielt sich die Wurzel. Diese Befunde stimmen mit den von Nestler mittels der Sublimation erhaltenen überein. Dadurch ist die Ansicht von Suzuki[2]) widerlegt, der den Sitz der Alkaloide in die Epidermis verlegte.

Suzuki legte Schnitte einerseits in eine 0,5 %ige Koffeinlösung zum Nachweis des Gerbstoffes, anderseits auf 2 Tage in eine 3,5 %ige Tanninlösung zur Alkaloidermittelung. Der Gerbstoff war in den Palisaden und im Schwammparenchym lokalisiert. Mit Tannin traten Fällungen in der Epidermis auf; wahr-

[1]) G. Bertrand, Sur les cafés sans caféine, Compt. rend., 1905, CXLI, S. 209.

[2]) N. Suzuki, On the localisation of theïne in the tea leaves, Tokyo, Imp. University, 1901, IV, S. 277.

scheinlich handelt es sich um Eiweiß, doch sollten die Fällungen im Gegensatz zur Eiweißfällung in verd. Ammoniak löslich sein. Welcher Körper hier in Reaktion tritt, ist bisher nicht nachgeprüft worden. Im Samen soll kein Alkaloid sein[1] (vielleicht sind geringe Mengen übersehen); es entsteht erst bei der Keimung.

Punicaceae.

Punica granatum.

In Punica granatum sind in der Rinde des Stammes und der Zweige (bis 0,7%, meist 0,09—0,3%), sowie in der der Wurzel (bis 1,1%, meist 0,2—0,3%) Alkaloide zugegen (Pelletierin, Isopelletierin, Pseudopelletierin, Methylpelletierin, Isomethylpelletierin); es sind Flüssigkeiten von stark basischem Charakter (Pseudopelletierin ist fest), die, in der Pflanze an Gerbstoff gebunden, in jeder Hinsicht noch wenig erforscht sind.

Einige mikrochemische Angaben, die auf die Alkaloide in der Droge hinweisen, macht Tschirch (Anat. Atlas, 1900, S. 85). Danach findet sich Pelletierintannat, resp. die Granatgerbsäure in den Zellen „der primären Rinde, in den Rindenstrahlen und in dem Phloemparenchym. Ihr Inhalt wird durch Kaliumpyrochromat tief rotbraun, durch Kaliumwismutjodid rotbraun, durch Phosphormolybdänsäure erst blutrot, dann rotbraun, durch Eisenchlorid blauschwarz, durch Kali tief orangerot“. Die innersten jüngsten Schichten der sekundären Rinde werden durch Phosphormolybdänsäure gelblich, durch Kalkwasser orangegelb gefärbt. „Legt man einen Schnitt in Sublimatlösung, so beobachtet man nach dem Eintrocknen zahlreiche bräunliche, quadratische Kriställchen, konzentrierte Schwefelsäure färbt braungelb, Goldchlorid wird reduziert und der Schnitt erscheint am Rande vergoldet.“

Umbelliferae.

Conium maculatum.

Coniin (Propylpiperidin), ein sauerstofffreies Alkaloid (Giesecke, 1827, Geiger, 1831, Ladenburgs Synthese, 1886), ist in reinem Zustande eine farblose, ölige, nach Mäuseharn riechende Flüssigkeit, die bei Luftzutritt schnell dunkelgelb wird. Es ist das Hauptalkaloid von Conium maculatum[2], in der Pflanze wahrscheinlich an Apfelsäure gebunden und wird aus zerstoßenen, nicht ganz reifen Früchten (nach Behandeln derselben mit Natriumkarbonat) durch Wasserdampfdestillation gewonnen. (Blühende Pflanze 0,03—0,18, Blätter 0,09, Früchte unreif bis 2,6, reif bis 1,12%). Barth hat mikrochemisch bei gekeimten Coniumfrüchten eine Abnahme an Alkaloid festgestellt, die er (irrtümlicherweise)

---

[1]) N. Suzuki, Contribution to the physiological knowledge of the Teaplant, Bull. Coll. Agric. Tokyo, 1901, IV, Nr. 4.

[2]) Nach G. de Sanctis soll Coniin in Sambucus nigra auftreten (Sull' esistenza della coniina nel Sambucus nigra, Gaz. chim. ital., 1895, S. 49).

auf einen Verbrauch zurückführte. Anema ermittelte in der Epidermis der Plumula bei ganz jungen Keimpflänzchen Neubildung und eigene Keimversuche zeigten, daß die Alkaloide bei im Dunklen gezogenen Keimpflänzchen nach mikrochemischer Schätzung mindestens ebenso reichlich auftreten als in belichteten Pflanzen. Clautriau und Rosoll betrachten die Alkaloide infolge ihrer peripheren Lokalisation als Schutzwaffen gegen Tiere.

Die ersten Autoren, die sich mit der Ermittlung der Lokalisation des Coniins beschäftigten (Anema[1]), Rosoll[2])), wandten als Reagens Jodjodkalium an, welches eine dunkelbraune Fällung verursacht. die Rosoll in Natriumhyposulfit löste, der auch zum Vergleich — Schnitte heranzog. Clautriau[3]) benutzte außerdem Jodkaliumquecksilberjodid und Phosphormolybdänsäure (letztere gibt einen sehr feinen Niederschlag, der durch Zusatz von Jodjodkalium sichtbarer gemacht werden kann) und Elfstrand[4]) noch Vanadinschwefelsäure (Blaufärbung), Kaliumwismutjodid (körnige. gelbe Fällung), Pikrinsäure (farblose Fällungen), Osmiumsäure (Blaufärbung) und Gerbsäure. Schließlich hat Barth[5]) noch herangezogen Goldchlorid und Bromwasser (brauner Niederschlag), sowie Brom- und Salzsäuredämpfe (sehr kleine, nicht doppelbrechende Kristalle). Herder[6]) ließ die Schnitte einige Stunden in Baryumquecksilberjodidlösung liegen, wusch mit Wasser aus und brachte sie dann in „eine 0,5 % mit ein paar Tropfen Salzsäure angesäuerte Kaliumbichromatlösung, die mit 30 % Chloralhydratlösung hergestellt war". Alkaloidzellen sollen gelbe Färbung annehmen. Die besten Reaktionen erhält man mit Jodjodkalium, Brombromkalium, auch mit Goldchlorid. Die kristal-

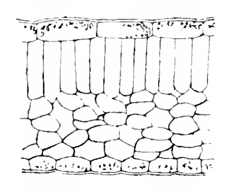


Fig. 81. Conium maculatum, Blatt (Querschnitt), Alkaloidfällung mit Brombromkalium in beiden Epidermen (Tunmann).

[1]) P. Anema, Sitz der Alkaloide in narkotischen Pflanzen, Neederl. Tydschr. voor Pharm., 1892, S. 212.

[2]) A. Rosoll, Über den mikrochem. Nachweis von Curcumin und Coniin in den vegetabilischen Geweben, Progr. Niederöster. Landes-Oberrealschule in Wiener Neustadt, 1894, XXIX, S. 1.

[3]) G. Clautriau, Localisation et signification des alcaloides dans quelques graines, Bruxelles, A. Manceaux, 1894 u. Ann. d. l. Soc. Belge d. Microsc., 1894, XVIII, S. 35.

[4]) M. Elfstrand, Studier öfer alkaloidernas lokalisation, företrädesvis inom familjen Loganiaceae, Upsala Universitets Årsskrift, 1895. Die Reaktionen von Elfstrand bestätigt Tschirch (Anat. Atlas, S. 160).

[5]) H. Barth, Dissertat., Zürich, 1898, S. 17.

[6]) M. Herder, Über einige neue allgemeine Alkaloidreagentien und deren mikrochemische Verwendung, Dissertation, Straßburg, 1905, S. 53.

linischen Ausscheidungen bei Salzsäuredämpfen sind sehr schwer zu erkennen.

Über die Lokalisation der Alkaloide in Conium maculatum ist bisher folgendes ermittelt: Coniin findet sich in den vegetativen Teilen ausgewachsener Pflanzen nur in der Epidermis (Fig. 81); ferner findet es sich in allen meristematischen Zellen der Vegetationsspitzen, sowie nach Rosoll im Phloemparenchym (in 3 mm starken Stengelteilen fand ich es dort nicht). In der Wurzel ist auch das subepidermale Rindenparenchym alkaloidhaltig. Die Angaben über die Lokalisation in nicht ganz reifen Früchten weisen Unstimmigkeiten auf. Die Hauptmenge tritt nach der übereinstimmenden Ansicht aller Autoren in den sogenannten Alkaloidschichten der Fruchtwand auf, Endosperm und Embryo sind alkaloidfrei. Anema gibt es außerdem für die Epidermis und für viele Parenchymzellen an, nach Clautriau führen auch die. die Bündel begleitenden Zellen Alkaloide. Tschirch findet Coniin in der gesamten Fruchtwand, vornehmlich in der Epidermis und in der Coniinschicht. In letzterer werden die Reaktionen modifiziert, möglicherweise durch Methylconiin, Conhydrin, Conylen oder durch einen ölartigen Körper. Anderseits spricht Barth die Epidermis für alkaloidfrei an und findet die Alkaloide in Übereinstimmung mit Clautriau, nur sollen die Alkaloide sich auf die Parenchymzellen der Außenseite der Bündel beschränken.

Um diese Widersprüche zu klären, wurden die verschiedenen Entwicklungsstadien von der Blüte bis zur Fruchtreife untersucht, wobei sich zeigte, daß tatsächlich die Epidermis Alkaloide führt. In den jüngsten Stadien ist in der Epidermis wohl ebenso viel Alkaloid enthalten als in der Coniinschicht. Im Laufe der Entwickelung schwindet epidermal das Coniin immer mehr. Es hängt also lediglich vom Stadium der Entwickelung ab, ob man in der Epidermis Alkaloidreaktionen erhält oder nicht. Übrigens lieferte bei diesen Untersuchungen mehrwöchentliches Einlegen halbierter Früchte in konz. wässerige Kupfersulfatlösung keine besseren Resultate als Brombrom- oder Jodjodkalium. Zu versuchen wäre noch eine Umsetzung der mit Kupfersulfat erhaltenen Fällung, sowie Kieselwolframsäure, welche neuerdings Javillier makrochemisch benutzte (Bull. scienc. pharm., 1910, XVII, S. 315).

Loganiaceae.

Gelsemium.

Die Chemie der mehrfach untersuchten Basen in Gelsemium sempervirens (Chinolinderivate, im Rhizom 0,17—0,2 %, Sayre [Pharm. Journ. and Pharm., 1911, S. 242], 1,2 % Moore [Journ. Chem. Soc., 1910, XCVII, S. 2223], der Stengel soll alkaloidfrei sein) ist noch nicht genügend geklärt. Selbst über

die Benennung der einzelnen Basen herrschen Differenzen. Sayre gibt 3 Basen an, Gelsemin, das in Ammoniak lösliche Gelsemoidin und das darin unlösliche Gelseminin.

Elfstrand[1]) gebrauchte zum Nachweis der Gelsemiumalkaloide Jodjodkalium (rotbrauner Niederschlag), konz. Schwefelsäure und Kaliumbichromat (rote, nicht grün werdende Färbung), konz. Salzsäure und konz. Salpetersäure (Kristallbildungen); am besten geeignet erwies sich Vanadinschwefelsäure (rote, langsam grün werdende Färbung), in günstigen Fällen ließen sich beide Alkaloide mit Salpetersäure unterscheiden, Gelsemin gab keine, Gelseminin eine grüne Färbung. Boelling (Lit. S. 307, 1) benutzte außerdem Chlorzinkjod und Kaliumwismutjodid (roter Niederschlag). Platinchlorid, Goldchlorid, Pikrinsäure,

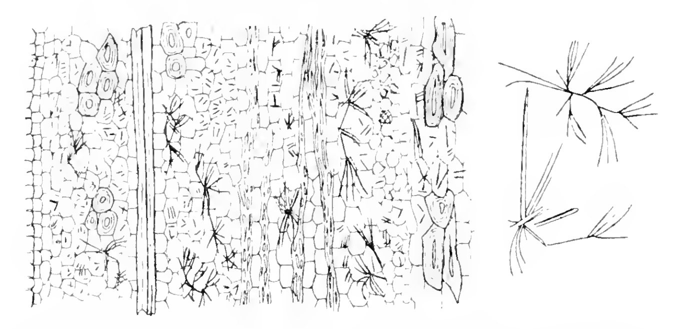


Fig. 82. Gelsemium sempervirens (Rhizom, Längsschnitt), Präparat 12 Stunden in Salpetersäuredampf, dann 2 Stunden in Paraffin, im Markstrahl einige Oxalate eingezeichnet (Tunmann).

(gelbliche Fällungen), Phosphormolybdänsäure (gelbweiße Trübung), Kaliumquecksilberjodid, Tannin, Bromwasser (grauweiße Trübungen). In den alkaloidhaltigen Zellen rief Molybdänschwefelsäure (mit gleichem Teile Wasser verdünnt) eine blaue Färbung hervor. Joddämpfe bilden einen körnigen braunen Niederschlag, Dämpfe von Salpetersäure nach 12 Stunden nadelförmige Kristalle. Letztere finde ich im polarisierten Lichte mit gelben Farben aufleuchten, die kleineren isoliert liegenden Nädelchen in den Zellen; außerdem haben sich größere Kristallgruppen auf den Präparaten abgeschieden. Je länger die Schnitte in Öl liegen, um so zahlreicher erscheinen die großen Kristallgruppen (Fig. 82). Die Schnitte selbst sind tief chromgelb gefärbt.

Im Blatte kommen nach Elfstrand die Alkaloide in der Epidermis und in der Nähe der Gefäßbündel vor, nach Boelling auch im Siebteil der Mittelrippe. Im Stamm fand sie Elfstrand in der primären

[1]) M. Elfstrand, Studier öfver alkaloidernas lokalisation, företrädesvis inom familjen Loganiaceae, Upsala, Universitets Årsskrift, 1895.

und sekundären Rinde, im inneren Leptom und in der Stärkeschicht des Markes; Boelling gibt im Gegensatz hierzu die Hauptmenge im äußeren Siebteil an, ferner sind primäres Rindenparenchym, inneres Phloem, aber auch Markstrahlen und Holzparenchym alkaloidhaltig. Und auch in der Wurzel treten sie vorzugsweise im äußeren Phloem auf, doch sind „die Markstrahlen des Holzes und das Holzparenchym nicht ganz alkaloidfrei". Beide Alkaloide sind in den gleichen Zellen lokalisiert.

In den Rhizomen und Ausläufern von Gelsemium elegans haben Gehe & Co. mehrere Alkaloide ermittelt, deren Reindarstellung noch nicht gelungen ist. Die Tartarate kristallisieren. Nach Kobert sind sie äußerst toxisch.

Zum mikrochemischen Nachweis können dienen (Tunmann)[1]: Brombromkalium, Jodjodkalium (starke braune Fällungen), Salpetersäuredampf (chromgelbe Färbung), Kaliumquecksilberjodid (Tropfen, selten Kristalle), Kalilauge (kleine Nädelchen). Soweit das dürftige Material, das bei dem Versand gelitten hatte, einen Schluß gestattet, sind die Basen lokalisiert: im gesamten Rindenparenchym, vorzugsweise in der Sklereidenzone; im Holze sind möglicherweise Spuren in den Markstrahlen: in den Blättern war kein Alkaloid zugegen. Der Kork ist ebenfalls alkaloidfrei.

Nach den bisherigen Befunden müssen wir annehmen, daß bei Gelsemium der Kork alkaloidfrei ist, während bei Strychnos die Alkaloide in größerer Menge sich im Kork anhäufen.

Strychnos.

Die Strychnosalkaloide (Strychnin und Brucin, weitere Alkaloide [Strychnicin] sind noch nicht sicher), 1819 von Pelletier und Caventou entdeckt, kommen (im Samen) als alkohollösliche Verbindungen vor. Brucin ist Dimethoxystrychnin und ebenso wie Strychnin ein Chinolinderivat. Sie kommen in vielen doch nicht in allen Str.-Arten vor, fehlen in Str. potatorum L. fil. (Samen), Str. laurina Wall. (Blatt, Holz), Str. monosperma Miq. (Blatt, Rinde). Str. spinosa (Frucht) soll nur zuweilen giftig sein. In einigen Fällen wurde teils nur Strychnin, teils nur Brucin gefunden; Str. nux vomica: Samen (2,74—5,34% Gesamtalkaloid, davon 47,16% Strychnin und 52,84% Brucin, C. C. Keller), Fruchtfleisch (1,4% Strychnin, 1% Brucin, Dunstan u. Short), Blätter (0,354% Brucin, kein Strychnin, Hooper), Holz (0,2285% Strychnin, 0,077% Brucin, D. Steiger), Rinde (1,6% fast nur Brucin, Beckurts, 6,4% Gesamtalkaloid, Smith, junge Rinde 3,1%, ältere Rinde 1,68% Brucin, Greenish), ältere Wurzeln (0,99% Gesamtalkaloid, und zwar 0,71% Strychnin und 0,276% Brucin, Herder); Str. ligustrina: Holz (2,26% nur Brucin), Rinde (7,38% Brucin, Greenish); Str. colubrina: Holz (0,96%), Rinde (5,54% Gesamtalkaloid,

[1]) O. Tunmann, Tai-tsa-ju, Gehes Ber., 1910, S. 153.

Greenish), Holz und Rinde von Blay-Hitam-Str. führen (Boehm) nur Brucin; Str. tieuté: Samen (1,5% Strychnin, Brucin in Spuren, Moens). Str. quaqua Gilg: Samen (0,026% Brucin, kein Strychnin, Sievers).

Heckel (Lit. S. 263, 1) faßte die Samenalkaloide als Baustoffe auf. Tunmann[1]) kam zu nachstehendem Ergebnis: Die Endospermalkaloide lassen sich während der Keimung außerhalb des Keimlings verfolgen. 1/3 gelangt durch Auslaugung ins Erdreich (Schutz der Keimwurzel?), 1/5 wird mit den Samenschalen abgeworfen, weitere Mengen überziehen die jugendlichen Keimblättchen in Form eines schleimigen Belages, der sehr fest haftet (möglicherweise als Schutz gegen Tierfraß dient, was um so notwendiger erscheint, da die Keimblätter lange Zeit die einzigen Assimilationsorgane sind). Nitrate entnimmt die Keimpflanze dem Boden. In der jungen Pflanze entstehen die Alkaloide unabhängig vom Lichte und vor dem Auftreten des Chlorophyllgrün und der Oxalate. Junge Laubblätter führen Alkaloide. Prozentgehalt an Gesamtalkaloid: Samen aus Saigon 2,98, abgeworfene Samenschalen 2,11, junge Keimwurzeln 4,48, ältere Keimwurzeln 3,72, hypokotyle Achsen 2,43, junge, noch gelbe Kotyledonen 6,62, ältere grüne Kotyledonen 4,65.

Die meisten Autoren studierten den Nachweis der Strychnos-Alkaloide im Samen, vorzugsweise in dem von Strychnos nux vomica. Lindt[2]) benutzt zum Nachweis von Brucin eine mit Selensäure versetzte Salpetersäure (auf 5 Tropfen Selensäure von 1,4 spez. Gewicht 1—2 Tropfen Salpetersäure von 1,2 spez. Gew.). Strychnin wird mit einer konz. Lösung von schwefelsaurem Ceroxyd in Schwefelsäure (das Salz muß im Überschuß der Schwefelsäure zugesetzt sein, die Lösung ist haltbar) nachgewiesen. Mit diesen Reagentien wird Brucin orange, Strychnin violettblau. Ausgehend von der Ansicht, daß fette Öle die Reaktionen beeinflussen, wurden aus den Präparaten durch Mazeration mit Petroläther oder mit absolutem Alkohol die Fette zuvor entfernt. Auch der Zucker sollte angeblich dadurch entfernt werden. Hierdurch mußten die Alkaloide aus dem Zellinhalte in die Membran verschleppt werden und so verlegt Lindt (irrtümlicherweise) den Sitz der Alkaloide bei den Samen von Strychnos nux vomica und Str. ignatii Berg in die dicken Wände des Endosperm. Durch Alkohol werden überdies die Alkaloide gelöst, und nur infolge zu kurzer Einwirkung waren sie noch nachweisbar.

Zur gleichen Zeit benutzte Rosoll[3]) konzentrierte Schwefelsäure zum Nachweis der Alkaloide im Samen von Strychnos nux vomica und

[1]) O. Tunmann, Über die Alkaloide in Strychnos nux vomica L. während der Keimung, Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 644.

[2]) O. Lindt, Über den mikrochemischen Nachweis von Brucin und Strychnin, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, S. 237.

[3]) A. Rosoll, Beiträge z. Histochemie d. Pflanzen, Sitzber. Wien. Akad., 1884, LXXXIX, S. 137.

Str. potatorum. Daß er Str. potatorum für alkaloidhaltig ansah, beruht auf unrichtiger Beobachtung. Beim Eintragen der Präparate des Endosperms in Schwefelsäure wurde der Inhalt gelb, dann schnell zwiebelrot, die dicken Membranen lösten sich ohne Farbenreaktion (sind also alkaloidfrei), die austretenden Fetttropfen sind farblos, werden aber bei Zusatz eines sehr kleinen Körnchens von Kaliumdichromat violett. Gerock und Skippari[1]) legen die Präparate auf mehrere Stunden in Kaliumquecksilberjodid (Fig. 83), übertragen sie nach wiederholtem Auswaschen mit Wasser in Schwefelwasserstoffwasser und beobachten in Glyzerin (schwarze körnige Fällung). Clautriau (Lit. S. 316, 3) benutzt Jodjodkaliumlösung bei Zusatz von Ammoniumkarbonat. Sauvan[2]) untersucht außer Strychnos nux vomica noch die Samen von Str. ignatii

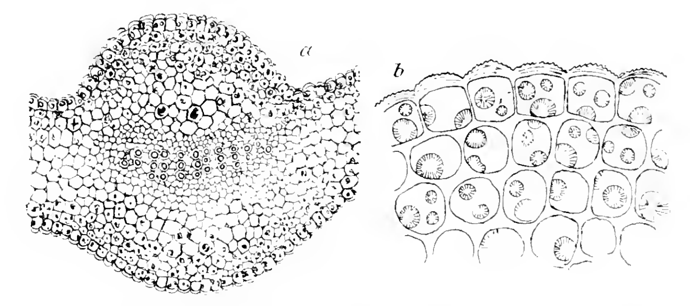


Fig. 83. Strychnos nux vomica, 3 cm langes Keimblatt, Hauptnerv. Fällung mit Kaliumquecksilberjodid. a) Übersichtsbild, b) Epidermis und angrenzendes Kollenchym (stärker vergrößert).

und Str. gaulteriana und verwendet salpetersäurehaltige Schwefelsäure sowie eine gesättigte Lösung von Ceriumsulfat in 75% Schwefelsäure (violette Färbung). Zur Entfernung des Brucins wird Kaliumbichromat benutzt, das mit Strychnin ein unlösliches, mit Brucin ein lösliches Salz bildet. Die Präparate werden zur Entfernung des Brucins mit 20% wässeriger Kaliumbichromatlösung mazeriert, dann wird auf Strychnin geprüft. Elfstrand (Lit. S. 316, 4) weist Brucin mit rauchender Salpetersäure, Strychnin mit Vanadinschwefelsäure (violette Färbung) nach. Letztere Reaktion soll einen annähernden Schluß auf die Menge des anwesenden Strychnins gestatten. Nach Tschirch (Anat. Atlas, S. 152) eignet sich für den Strychninnachweis „das Cer am wenigsten, das

---

[1]) J. E. Gerock und F. J. Skippari, Über den Sitz der Alkaloide im Strychnossamen, Arch. d. Pharm., 1892, CCXXX, S. 555.

[2]) M. L. Sauvan, Untersuchungen über die Lokalisation von Brucin und Strychnin in den Samen von Strychnos nux vomica u. a., Journ. de Bot., 1896, X, S. 133.

Vanadin am besten". Beim Brucinnachweis erhöht ein Zusatz von Salzsäure zur Salpetersäure die Lebhaftigkeit der orangegelben Färbung. Salpetersäurehaltige Selensäure wirkt nicht besser als Salpetersäure allein.

Die allgemeinen Alkaloidreagentien wurden erst 1898 von Barth (S. 47 in der S. 274, 4 gen. Dissert.) benutzt. Platin- und Goldchlorid geben gelbweiße fein kristallinische Niederschläge, Ferrocyankalium und Salzsäure ($^2/_3$ und $^1/_3$ 25%ige Salzsäure), ferner Bromwasser, Pikrinsäure, Quecksilberchlorid, Natronlauge, Natriumkarbonat, Rhodankalium und Kaliumwismutjodid (Fig. 84) geben mehr oder weniger deutlich kristallinische Ausscheidungen. Str. potatorum L. fil., Str. spinosa Lam. waren alkaloidfrei, hingegen gelang der Nachweis bei Samen von Str. ignatii, Str. spinosa Harvey und Str. tieuté. Später wandte Herder (S. 39 in der S. 288, 3 gen. Dissert.) in 30% Chloralhydratlösung sowohl Caesiumquecksilberjodid (Empfindlichkeitsgrenze für Strychnin 1 : 40000, für Brucin 1 : 10000), als auch auf Baryumquecksilberjodid (Strychnin 1 : 43000, für Brucin 1 : 11000) an. Diese Niederschläge sind aber schwer zu erkennen.

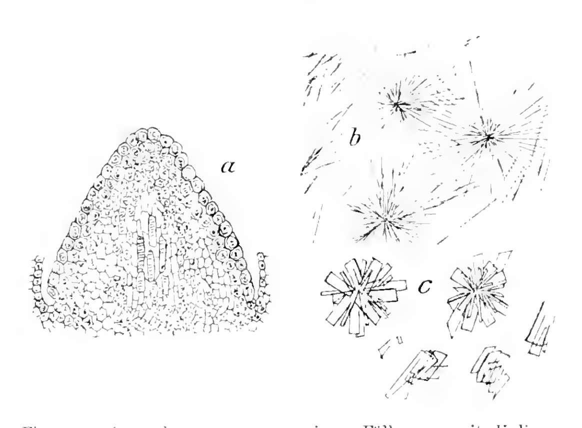


Fig. 84. Strychnos nux vomica, Fällungen mit Kaliumwismutjodid. *a*) Plumula mit Ansatzstellen der Keimblätter, *b*) mit Brucin, *c*) mit Strychnin.

Abgesehen von dem auf fehlerhafte Präparation fußenden Resultat von Lindt, der den Sitz der Alkaloide in die Membran verlegt und zum Teil von Elfstrand und Tschirch[1]) unterstützt wird, stimmen die Ergebnisse der anderen Autoren darin überein, daß im Endosperm von Strychnos nux vomica die Alkaloide nur im Zellinhalte auftreten, nach Rosoll vorzugsweise im Öl, nach Gerock und Skippari im Plasma, Öl und Plasmodesmen, nach Elfstrand und Tschirch im Ölplasma und in den Aleuronkörnern, nach Barth und Tunmann nur im Ölplasma. In den Plasmodesmen sahen Gerock u. Skippari körnige Fällungen, die sie für Alkaloide hielten, Barth fand diese nicht. Die Fällungen kommen jedoch bei längerer Einwirkung der Reagentien vor (auch bei Zusatz von Jodjodkalium) und sind nach meiner

[1]) A. Tschirch, Angew. Pflanzenanatomie, 1889, S. 130.

Ansicht die bekannten körnig-stäbigen Fällungen der Plasmodesmen (s. d.), welche mit Alkaloiden nichts zu tun haben. Die Plasmodesmen der ruhenden und keimenden Samen sind alkaloidfrei. Während im Embryo Sauvan und Clautriau beide Alkaloide angaben, Elfstrand nur Protein und Fett fand, ist nach Barth und Tunmann nur Brucin zugegen. Doch soll nach Barth der Keimling des brucinarmen Samens von Str. spinosa alkaloidfrei sein. In Wurzel- und Stammrinde gibt Herder die Hauptmenge der Alkaloide im Kork an, dort soll nur Brucin sein, während im Innern und im Holze Strychnin überwiegt. Über die Verhältnisse während der Keimung hat Tunmann Angaben gemacht (Fig. 83 u. 84), aus denen hervorgeht, daß die allgemein in die Literatur übergegangene Ansicht Pictets, nach der erst Strychnin entsteht, dieses in Brucin übergeführt wird (und nach dem Kork wandert) nicht den Tatsachen entspricht. Sollte die Pflanze Brucin nur aus Strychnin bilden können?

In der Rinde von Str. tieuté kommt Strychnin nur im Kork vor, Brucin fehlt [1].

Curare, das bekannte Pfeilgift, ist ein Extrakt verschiedener Strychnosarten (Str. toxifera Bth., Str. Castelnaei, Str. Crevauxii, Str. Gubleri); es enthält mehrere Alkaloide (Chinolinabkömmlinge, kristallisierbares Curin, amorphes Curarin und Protocurin u. a.), deren chemische Erforschung wir Boehm [2]) verdanken.

Zum Curarinnachweis benutzte Elfstrand (Lit. S. 316, 4) konz. Schwefelsäure (karminrote Färbung), konz. Salpetersäure (blutrot), Vanadinschwefelsäure (rotviolett) und Sauvan (Lit. S. 321, 2) außer diesen Reagentien noch Erdmanns Reagens (rot), verd. Schwefelsäure (karminrot), Cersulfat-Schwefelsäure (violett). In der Rinde sind die Curarebasen im Bast, im äußeren Parenchym und im Kork, in den Blättern im Mesophyll lokalisiert. Boehm fand sie fast ausschließlich im Kork, sowohl bei südamerikanischen als auch bei asiatischen Strychnosrinden.

Strychnochromin, welches kein Alkaloid ist und schon Pelletier und Caventou bekannt war, findet sich ebenfalls nur im Kork und wird von konz. Schwefelsäure und konz. Salpetersäure grün.

Solanaceae.

Atropa belladonna, Datura stramonium, Hyoscyamus niger.

Die Hauptmenge der Basen bilden Hyoscyamin, welches bei der Verarbeitung der Pflanzen durch molekulare Umwandlung in Atropin übergeht. Daneben treten

[1]) C. Hartwich u. H. Geiger, Beiträge zur Kenntnis der Ipoh-Pfeilgifte und einiger zu ihrer Herstellung verwendeter Pflanzen, Arch. d. Pharm., 1901, CCXXXIX, S. 491.

[2]) R. Boehm, Über das südamerikanische Pfeilgift Curare.

noch andere Basen auf, die von Ladenburg, E. Schmidt u. a. eingehend studiert wurden und worüber die chemische Literatur einzusehen ist. In der Mikrochemie ist man auf den Nachweis der einzelnen Basen noch nicht eingegangen und hat sich mit der Ermittelung der Gesamtalkaloide begnügt. Bei sachgemäßer Kultur ist der Alkaloidgehalt ebenso groß wie in wildwachsenden Pflanzen. Von Einfluß ist außer dem Boden auch die Witterung. — Burmann erhielt bei Atropa des gleichen Standortes (Aigle, Kt. Waadt) 1907: 0,094, 1908: 0,082, 1909: 0,045, 1910: 0,046, 1911: 0,099 % Atropin. Der Gesamtalkaloidgehalt der Droge geht oft unter 0,3 % herunter, 1911 betrug er infolge der Witterung 0,336—0,606 % (Caesar u. Loretz). Sonnenblätter führen etwas mehr Alkaloid als Schattenblätter (Unger, Apoth.-Ztg., 1912). 3jährige Kulturpflanzen (Kalifornien) hatten 0,519 % Gesamtalkaloid (Sayre) und zwar die Blätter 0,642, jüngere Stengel 0,431, ältere Stengel 0,167 %. Wurzeln führen bis 0,5, Samen bis 0,8 %. — In Datura fand Feldhaus im Samen 3,33, in der Hauptwurzel 0,1, in Seitenwurzeln 0,25, Blättern 0,39, Stengel 0,54, Corolle 0,43, reifen Samen 0,48, im Keimling 0,67 % Gesamtalkaloid. Bei Kulturpflanzen war (Mitlacher und Wasicky) der Gehalt der Blätter auf gedüngtem Boden 0,342, ungedüngt 0,325 %; die reifen Samen enthielten ungedüngt 0,279, gedüngt 0,283 %, die unreifen 0,299 und bei gedüngtem Boden 0,309 %. Chevalier hatte zuvor einen höheren Gehalt durch Düngung mit mineralischem Stickstoffdünger, Nitrat und Stallmist, erhalten. Die Abnahme der Samenalkaloide bei der Keimung (Barth) beruht auf Auslaugung (Feldhaus). Die individuellen Unterschiede sind gering, D. stramonium 0,46—0,55, D. tatula 0,47—0,63 % (Miller und Maeder, 1912). — In Hyoscyamus schwankt der Alkaloidgehalt bedeutend, in frischen Blättern sind im Mittel 0,15, in frischen Samen 0,3—0,5 % enthalten, die Droge soll 0,07 % Hyoscyamin führen, Caesar und Loretz fanden 1912: 0,043—0,072 %.

Solaneen sind geeignete Objekte zum Studium über die Wanderung der Alkaloide bei Pfropfungen (Linsbauer u. Grafe, A. Meyer u. E. Schmidt, M. Javillier). Sicher gestellt ist die Wanderung der Basen über weitere Strecken. Die Wanderung erfolgt im Leitparenchym. Die meisten Autoren sprechen die Solaneenbasen als Abbauprodukte und Schutzstoffe an.

Mikrochemisch sind Atropa, Hyoscyamus und Datura wiederholt eingehend studiert worden. Am besten hat sich Jodjodkalium (brauner Niederschlag, bisweilen sternförmige Kristalle von metallischem Aussehen) bewährt, das, seit es de Wèvre[1]) zuerst benutzte, allen späteren Autoren diente. Auch Anema[2]) ging mit Jodjodkalium vor und in neuester Zeit benutzte es Troegele[3]) bei Atropa „ausschließlich“.

---

[1]) A. de Wèvre, Localisation de l'atropine, Bull. Soc. belge de Microsc., 1887, XIV, S. 19—22.

[2]) P. Anema, Sitz der Alkaloide in narkotischen Pflanzen, Neederl. Tydschr. voor Pharm., 1892, S. 212.

[3]) F. Troegele, Über das Verhalten der Alkaloide in den Organen der Atropa Belladonna L., Würzburger Diss., 1910.

de Wèvre wandte noch Phosphormolybdänsäure an (gelber Niederschlag) und Clautriau[1]) außerdem noch Kaliumquecksilberjodid (weiße, schwer sichtbare Fällung) während Molle[2]) noch heranzog Pikrinsäure, Tannin, Platinchlorid und Goldchlorid (starke, gelbe Fällung). Diese Reagentien bewährten sich ebenfalls bei Scopolia japonica. Barth[3]) empfiehlt Joddämpfe (braune Fällung), Bromdämpfe (gelbe Fällung), Bromwasser (kleine Kriställchen neben gelben amorphen Klumpen) und Siim Jensen[4]) hält am geeignetsten (bei Hyoscyamus): Jodjodkalium, Kaliumwismutjodid, Joddämpfe, Bromwasser und Brombromkalium. Letzteres Reagens (S. 268) wird hier zum ersten Male zum mikrochemischen Alkaloidnachweis herangezogen und ist empfindlicher als Bromwasser (Fig. 85).

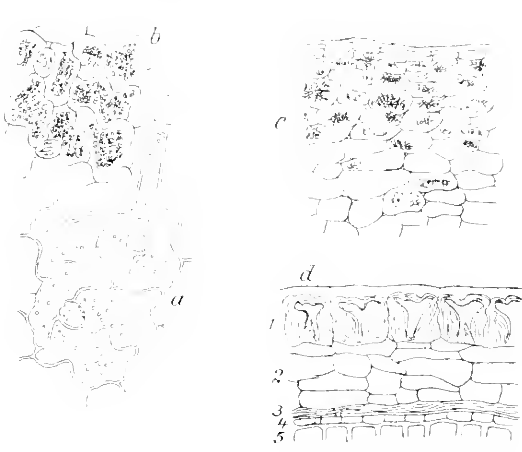


Fig. 85. Atropa belladonna, Fällungen mit Brombromkalium: a und b obere Blattepidermis, a) bei Beginn der Einwirkung und b) nach einiger Zeit; c) Wurzel, äußeres Parenchym. d) Datura stramonium, nicht ganz reifer Samen. Schicht 3 führt Alkaloide (Tunmann).

Da die Fällungen (ausgen. mit Jod) oft erst nach Stunden entstehen und in dieser Zeit die Reagenslösungen zum Teil verdunsten, umzieht Molle die Deckgläser mit Wachs. Barth hat die mit Goldchlorid oder mit Kaliumquecksilberchlorid behandelten Präparate ausgewaschen und in Schwefelwasserstoffwasser gebracht (Schwarzfärbung der Alkaloidzellen). Die Präparate (besonders der Samen) dürfen vorher nicht in Wasser gelegen haben.

In den Ergebnissen zeigen die Untersuchungen im wesentlichen

[1]) G. Clautriau, Localisation et signification des alcaloides dans quelques graines, Bull. de la Soc. belge de Microsc., 1894, XVIII, S. 35.

[2]) Ph. Molle, Rech. de microchimie comparée sur la localisation des alcaloides dans les Solanacées, Bull. Soc. belge de Microsc., 1895, XXI, S. 8 und: Mém. de l'Acad. royale de Belg., 1895, LIII.

[3]) H. Barth, Studien über den mikrochemischen Nachweis von Alkaloiden, Dissertation, Zürich, 1898, S. 25.

[4]) Siim Jensen, Beiträge zur botanischen und pharmakognostischen Kenntnis von Hyoscyamus niger, Dissertation, Marburg, 1900. Bibl. botanica. 1901, Heft LI.

Übereinstimmung. Am eingehendsten wurden die Samen untersucht. Die Alkaloide treten in der Nährschicht auf, die Epidermis ist alkaloidfrei. Die Angabe Barths, daß „Endosperm und Embryo vielleicht Spuren" enthalten, wird in dem untersuchten Material begründet sein (nicht ganz reife Samen). In den vegetativen Teilen von Hyoscyamus verfolgte Siim Jensen sehr eingehend die Alkaloide: sie finden sich im Fruchtknoten in beiden Epidermen der Fruchtknotenwand, weniger im Parenchym und in den Placenten: im Kelche sind die den Siebsträngen anliegenden Parenchymzellen alkaloidhaltig, in der Kronenröhre das die Gefäße umgebende Parenchym. Im Blatte fanden sich Alkaloide im Phloemparenchym, im jungen Blatte, das alkaloidreicher ist, auch im Mesophyll, nie aber, im Gegensatz zu Molle, in der Epidermis. Die sekundär verdickte Achse führt Alkaloid: in der Epidermis, in der primären Rinde, im Parenchym der Rindenstränge, in den, an das Mark grenzenden Siebsträngen, im Mark und in den Markstrahlen von Rinde und Holz. In der Wurzel wurden sie nachgewiesen: in der Korkschicht, im Phellogen, im Phelloderm, im Phloemparenchym und in den Markstrahlen der Rinde.

Zu weiteren Studien wäre Hyoscyamus muticus zu empfehlen, die im Mittel 0,75 %, fast ausschließlich Hyoscyamin enthält, in den Blättern sogar 1,34, im Samen bis 1,17 %.

Bei Atropa erscheinen in den Kotyledonen der Keimpflänzchen die Basen zunächst im Stielchen, dann in der Basis der Blätter, schließlich in der ganzen Spreite. In den Laubblättern ist der Gehalt während der Blütezeit am größten, sinkt dann andauernd. Die Bildung in den Blättern ist nicht vom Lichte abhängig. Im Blütenstiel ist das Mark am gehaltreichsten, der Pollen ist nach Trögele alkaloidfrei. Unreife, weiße Samen sind alkaloidreicher als reife, in den Perikarpien sinkt der Gehalt während der Fruchtbildung. Embryo und Endosperm sind alkaloidfrei (s. oben), die Alkaloide des Keimlings entstehen durch Neubildung. Bei Verwundungen findet in dem, der Wunde benachbarten Gewebe eine Anhäufung der Alkaloide statt. Die Wurzel führt Alkaloide in der Epidermis, in subepidermalen Zellen und in Zellen, die den äußeren und inneren Siebteilen benachbart sind (Fig. 85). Im Stengel sind sie in Epidermis, 2—3 subepidermalen Zellschichten, in Zellen, die dem Phloem angrenzen, und in der Peripherie des Markes, sowie im Blatte in allen Teilen, besonders in der oberen Epidermis.

Nicotiana.

Das Hauptalkaloid der Nicotiana-Arten, das von Posselt u. Reimann 1828 isolierte Nikotin (ein Pyridinderivat mit der β-ständigen Seitenkette $-C_5H_{10}N$), ist eine flüssige, farblose, an der Luft schnell braun werdende, sauerstoffhaltige

Base. Außerdem kommen in geringer Menge Nikotein (flüssig), Nikotimin (flüssig), Nikotellin (kristallinisch) vor (Pictet und Rotschy). Sämtliche Alkaloide sind an Apfelsäure oder Zitronensäure gebunden. Der Gesamtgehalt an Alkaloid ist in den einzelnen Arten recht verschieden (von 0,3 bis 5%, Kissling); bei Elsässer Tabak (Feldsamen) 0,09, bei Eckboldsheimer 0,56%. Individuelle Unterschiede im Gehalt zeigen sich im Blatt von 0,25—0,57%, in der Hauptachse von 0,07—0,15%. In der Basis und in der Mitte der Achse sind annähernd gleiche Mengen, die Spitze ist alkaloidärmer (Basis 0,129, Mitte 0,132, Spitze 0,074%). (R. Gaze, Apoth.-Ztg., 1911, XXVI, S. 938). Als Versuchsobjekte sind somit die basalen Blätter zu wählen. Im Gegensatz zu Errera, der Nikotin als Schutzmittel gegen Tiere auffaßt, stellt de Toni fest, daß sich viele Tiere von Nikotiana ernähren.

Zum Nachweis des Nikotins im Gewebe können folgende Reagentien dienen: Jodquecksilberjodkalium (weißgelbliche Fällung), Phosphormolybdänsäure (gelbliche Fällung), Quecksilberchlorid (weißer, in überschüssigem Chlorammonium in der Wärme leicht löslicher Niederschlag), Platinchlorid (gelbliche Fällung), Jodjodkalium (erst braune Färbung, dann rotbrauner Niederschlag, der sich beim Erwärmen sofort auflöst, bei gewöhnlicher Temperatur langsam verschwindet). Diese schon von Maistriau[1]) bei Nicotiana macrophylla benutzten Reagentien haben sich bewährt (Molle). Anema[2]) bestimmte den Sitz der Alkaloide mit Jodjodkalium und de Toni[3]) gebrauchte außerdem noch Tanninlösung, Jodsäure-Jodjodkalium und Kaliumwismutjodid. Schärfere Reaktionen erhielt ich bei vorherigem Eintragen dickerer Schnitte lebender Pflanzen in heißen Alkohol ($^1/_2$—1 Minute). Die Lokalisation leidet hierbei nur wenig.

Die Angaben über die Lokalisation lauten übereinstimmend. Die Befunde Maistriaus wurden bestätigt. Samenknospen, Samen und ganz junge Pflänzchen sind alkaloidfrei (Anema, de Toni). Reich an Alkaloiden sind die Vegetationsspitzen, junge Achsen und junge Blättchen (Maistriau). Die Alkaloide sind in folgender Weise lokalisiert: in der Wurzel: im Hypoderm und in 4—5 Reihen der Außenrinde; im Stengel: in der Epidermis und in Trichomen (besonders in den Basalzellen derselben), ferner im Mark, Rindenparenchym und in den Markstrahlen; im Blatt: in der Epidermis (wenig), im Mesophyll (reichlich), Nervenparenchym; im Blattstiel in der Umgebung der Bündel; im

[1]) Maistriau in Prem. recherch. s. l. localis. et significat. des alcaloides, Bruxelles, 1887, S. 13 des Sep.

[2]) P. Anema, Sitz d. Alkaloide in narkot. Pflanzen, Neederl. Tydschr. voor Pharm., 1892, S. 212.

[3]) G. B. de Toni, Ricerche istochimice preliminari sulla pianta del Tabacco. Localizzazione della nicotina, Atti del R. Ist. Veneto di scienze, 1893, IV, S. 1736.

Blütenstiel im Kollenchym; im Kelch der noch nicht geöffneten Blüte und in der noch grünen Blumenkrone in der Epidermis und in einigen Parenchymzellen; in der geöffneten Blüte sind die Kronenblätter, soweit sie gefärbt sind, d. h. nicht vom grünen Kelch bedeckt werden, alkaloidfrei (Anema). Schließlich sind Alkaloide ermittelt in Epidermis und Parenchym der Staubfäden, in der Epidermis der Stempel und Fruchtblätter, in der Epidermis der Placenta. Für getrocknete Tabakblätter konnte Molisch (Histochemie) keine mikrochemisch brauchbare Nikotinreaktion finden.

Weitere Solaneen wurden von Molle untersucht. Bei Nicandra physaloides waren Phosphormolybdänsäure, Kaliumquecksilberjodid, Tannin ohne Erfolg, während Jodjodkalium einen braunen, bläulich schimmernden, Goldchlorid einen schmutzigbraunen, Pikrinsäure einen braunen Niederschlag erzeugte. Bei Physalis Alkekengi bewährten sich Jodjodkalium (gelbbrauner, bald farblos werdender Niederschlag), sowie Goldchlorid (hellgelbe Fällung) und Phosphormolybdänsäure (gelbbrauner Niederschlag). Die Alkaloide von Petunia violacea lassen sich mit Jodjodkalium, Phosphormolybdänsäure, Pikrinsäure und Goldchlorid nachweisen, wobei bräunliche Niederschläge entstehen, die jedoch bald verschwinden. Bei Salpiglossis sinuata lassen sich Jodjodkalium, Goldchlorid, Kaliumquecksilberjodid verwenden; es entstehen bräunliche Niederschläge, doch sind nur die mit Jodjodkalium erzeugten, bläulich schimmernden bleibend. Die Alkaloide in Brunfelsia americana gaben mit Kaliumquecksiberjodid einen braunen, bläulich schimmernden, mit Phosphormolybdänsäure und Goldchlorid gelbliche Niederschläge.

Die Untersuchungen Molles bei diesen Pflanzen, die von anderer Seite bisher noch nicht nachgeprüft und ergänzt wurden, führten zu folgendem Resultat: In ausgewachsenen Teilen sind die Alkaloide beschränkt auf Epidermis und die die Gefäßbündel umgebenden Schichten; im Blatt auf Epidermis und Phloem, in der Wurzel auf Rindenparenchym und Peridermelemente. Blüte, Samenknospe und Karpelle enthalten ebenfalls häufig Alkaloide, doch verschwinden sie bei der Reife ganz oder teilweise; auch Endosperm und Embryo reifer Samen sind alkaloidfrei.

Solanin.

Solanin, ein glykosidisches Alkaloid, das bei der Hydrolyse Zucker und Solanidin gibt, wurde 1822 von Desfosses in den Früchten von Solanum nigrum aufgefunden. Es wird aus zerriebenen frischen Kartoffelkeimen gewonnen und bildet in reiner Form weiße glänzende Nadeln, die nicht in Wasser, nur wenig in Alkohol, Äther, Benzol und leicht in heißem Alkohol löslich sind und einige charakteristische Farbenreaktionen geben. Es ist in der Gattung Solanum weit

verbreitet und findet sich in S. tuberosum, S. nigrum, S. dulcamara, S. carolinense, S. jasminoides, S. sodomeum, S. mammosum, S. verbascifolium, S. auriculatum, ferner in Capsicum annuum, Lycopersicum esculentum, Scopolia atropoides, Sc. japonica, Sc. carniolica, Physalis alkekengi, Physochlaena orientalis u. a. Es ist aber fraglich, ob diese Angaben sämtlich zu Recht bestehen, denn nach den Untersuchungen von Masson (Bull. scienc. pharm., 1912, XIX, S. 283) führt S. dulcamara kein Solanin, sondern Solacein, welches bei der Hydrolyse Solanidin liefert. Auch in den unterirdischen Teilen dieser Pflanzen (Knollen, Wurzeln) tritt Solanin auf, vornehmlich in den jungen Sproßtrieben, wie denn ganz allgemein die größten Solaninmengen in jungen Organen und außerdem in den peripheren Teilen (Schalen der Knollen, Rinde, Epidermis) anzutreffen sind. Die Menge schwankt ungemein.

Bei der Keimung (Solanum, Capsicum) fand Albo[1]) starke Zunahme an Solanin, bei der Bildung sollen Bakterien beteiligt sein (Weil, 1898). Die Anhäufung an Wundstellen deutet auf eine schützende Funktion des Solanins hin. In etiolierten Keimlingen bildet es sich ebenfalls, doch in geringer Menge; es soll ein Reservestoff sein.

Zur Lokalisationsermittelung gebrauchte Schaarschmidt[2]) Salpetersäure (die aber unbrauchbar ist, da reines Solanin keine oder doch nur eine schlechte Farbenreaktion damit gibt) und Schwefelsäure. Letztere färbt solaninhaltige Zellen hellgelb, rötlich, violettrot, grünlich, dann verblaßt die Färbung. Auch Theorin[3]), nach dem Solanin im Knollen von Solanum tuberosum entsteht und von dort in die jungen Triebe und in die Früchte gelangt, bediente sich der Schwefelsäure. Die Schnitte gelangen direkt in die Säure. Schaarschmidt gibt für S. tuberosum, nigrum, dulcamara, Capsicum annuum, Lycopersicum esculentum, Mandragora officinalis Solanin an in der Wurzel (subepidermal), Fruchtschale (zerstreute Parenchymzellen), Stengel (subepidermales Kollenchym) und im Blatt (Nerven, nicht Mesophyll, nur bei Lycopersicum sind die „äußersten Zellen des Schwammparenchyms“ solaninhaltig).

Wothtschall[4]) untersuchte verschiedene Solanum- und 3 Scopolia-Arten und benutzt Selenschwefelsäure (0,3 g selensaures Natrium, 8 ccm Wasser, 6 ccm konz. Schwefelsäure), die noch mit 0,00003 g Solanin deutliche Reaktionen gibt. Die Präparate werden in Selenschwefelsäure ganz schwach erwärmt. Die Solaninzellen werden

---

[1]) G. Albo, Sulla funzione fisiologica della Solanina, Contrib. alla Biol. veg. Palermo, 1899, II, S. 185.

[2]) J. Schaarschmidt, Über die mikrochem. Reaktion des Solanins, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, S. 61.

[3]) P. G. Theorin, Einige pflanzenmikrochemische Notizen, Sv. Vet. Ak. Stockholm, 1885, Nr. V, S. 29.

[4]) E. Wothtschall, Über die mikrochemischen Reaktionen des Solanin, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1889, V, S. 19, und Pharm. Journ. and Transact., 1890, S. 50.

himbeerrot, dann johannisbeerrot, gelblich und schließlich farblos. Die gleichen Reaktionen erhält man, wenn man das selensaure Natrium durch Tellursäure ersetzt (Bauer, Ztschr. ang. Chem., 1899, S. 99). Vanadinschwefelsäure (frisch bereitet aus 0,1 Teil vanadinsaurem Ammonium und 100 Teilen eines Gemisches von 9,8 Teil. konz. Schwefelsäure und 3,6 Teil. Wasser), mit der sich noch 0,01 mg Solanin nachweisen lassen, ruft innerhalb mehrerer Stunden nachstehende Farben hervor: gelb, orange, purpurrot, bräunlichrot, karmin, himbeerrot, violett, blauviolett, blaßgrünlichblau, dann folgt Entfärbung. Mir gelang es nicht, alle diese Farbenumschläge festzustellen. Fette Öle, die bei den Methoden (bei Gegenwart von Zucker und Eiweiß) ebenfalls in Reaktion treten können, entfernt Wothtschall durch kurzes Eintauchen der Präparate in Äther (10—15 Minuten). In den ausgewachsenen Organen ist der Solaningehalt in der Rinde am größten. Die arzneilich benutzten Stengel von S. dulcamara (Stipites) gaben in der Rinde deutliche, im Mark schwache, im Gefäßbündelring keine Reaktion. Solanin fand ich nur im Zellsaft. Wothtschall hat es auch in der Membran angetroffen. Wahrscheinlich war dieses bei getrocknetem Material der Fall. Bei mit Äther behandelten Präparaten geben allerdings die Membranen Solaninreaktion, da der Äther, der das Fett entfernen soll, Spuren von Solanin in die Zellwände überführt. In den Solaninzellen tritt gleichzeitig Gerbstoff auf, wodurch die Farbenreaktionen abgeändert werden (Molle).

Die angeführten Reaktionen genügen zum mikrochemischen Nachweis. Doch können sie nur dann als beweisend gelten, wenn aus den betreffenden Objekten Solanin mit Sicherheit makrochemisch isoliert wurde. Auf Grund mikrochemischer Reaktionen allein darf eine Pflanze nicht für solaninhaltig erklärt werden, denn bei der alkaloidreichen Familie der Solanaceen können andere (noch unbekannte) Alkaloide ähnliche Reaktionen bedingen.

Kommt es nicht auf die Ermittelung der Lokalisation, sondern nur auf die Feststellung des Solanins an, dann stellt man sich etwas Solanin dar. Man zieht die fein zerkleinerten Objekte mit weinsäurehaltigem Wasser aus, filtriert, neutralisiert das Filtrat mit gebrannter Magnesia, dampft zur Trockne, nimmt den Rückstand mit heißem Alkohol auf und filtriert sofort ab. Gelatinieren des Filtrates zeigt größere Solaninmengen an. Mit diesem alkoholischen Auszug lassen sich nun die Reaktionen ausführen. Missaghi[1]) dampft einige Tropfen Solaninlösung mit verd. Platinchloridlösung bei 60—70° im Uhrglase ein, worauf rote bis violette Färbung erfolgt.

Die meisten Solanin-Zellen führen gleichzeitig den basischen Spaltling des Solanins, das Solanidin, welches in Äther und Chloroform

[1]) G. Missaghi, Ber. chem. Ges., 1876, IX, S. 83.

unlöslich ist und mit Kaliumquecksilberjodid, Jodjodkalium, Pikrinsäure (gelbe, in Essigsäure unlösliche Fällung) und Goldchlorid Reaktionen gibt (Molle, Lit. S. 325, 2).

Scrophulariaceae.

In der Epidermis von Linaria striata erhielt Dufour[1]) mit Jodjodkalium einen braunen, fein kristallinischen Niederschlag; nähere Angaben fehlen.

Rubiaceae.

Cinchona.

Pelletier und Caventou fanden 1820 Chinin und Cinchonin in der Chinarinde, gegenwärtig kennt man in den Cinchona-Arten einige 20 Basen der Chinolingruppe, die meist gut kristallisieren. Neben diesen kristallisierbaren Basen kommen auch amorphe Basen, vorzugsweise in den Blättern und in jüngeren Zweigen, vor. Die Alkaloide sind in allen Teilen der Cinchonen enthalten, in Spuren in den Organen der Blüten, auch im Pollen, in den Kotyledonen der Keimpflanze, im zentralen Gewebe der Knospenschuppen, in den Blättern (hypodermales Gewebe, Palisaden, Schwamm- und Nervenparenchym, Lotsy). Das Holz der Bäume ist arm an Alkaloid (bis 0,5 %). In der Rinde sind die Bastfasern (C. Müller), die Siebröhren (Lotsy) und die Sekretzellen (Charpentier), alkaloidfrei. Die Rindenalkaloide sind ausschließlich im Parenchym des Phloems und der Außenrinde (de Vrijs u. a.), besonders reichlich im Wundparenchym lokalisiert. In den Zellen sind die Basen an Chinasäure und Chinagerbsäure gebunden und entstehen immer in nachstehender Reihenfolge: amorphes Alkaloid, Cinchonin, Cinchonidin, Chinin, Chinidin.

Der Prozentgehalt der Chinarinde an Alkaloid ist bekanntlich abhängig von der Art der Bastardierung, von Kultur, Klima, Boden u. a. de Vrijs vermutete, Lotsy suchte zu beweisen, daß die Basen in den Blättern entstehen und von dort in den Stamm abwandern. Die Rindenalkaloide sollten also nur Umsetzungsprodukte der Blattbasen sein. Nach van Leersum (Ak. v. Wet., Amsterdam, 1910, S. 116) findet eine Abwanderung nicht statt (Ringelungsversuche), die Blattbasen stehen mit der Assimilation in keinem Zusammenhang, sie sind nur Abbauprodukte. Die Witterung soll die Alkaloidbildung nicht beeinflussen.

Bei der Untersuchung wird es sich meist um den Nachweis der Alkaloide in Schnitten der Droge handeln, da die Beschaffung lebenden Materials schwierig ist. Außerdem kann der Nachweis in Auszügen (Behrens) erbracht werden.

Die Ermittelung der Lokalisation der Basen in der Droge beansprucht geschichtliches Interesse. Von verschiedener Seite werden Prioritätsansprüche erhoben. Eine eingehende Darstellung erscheint hier angebracht.

---

[1]) J. Dufour, Notices microchimiques sur le tissu épidermique des végétaux, Bull. Soc. vaud. d. Sc. nat., 1886, 3. sér., XXII, S. 134.

Wohl die erste Untersuchung rührt von Oudemans[1] her, der Schnitte der Droge von C. calisaya u. rubra in mit Ammoniakgas gesättigten Alkohol legte und nach dem Verdunsten des Reagens vierseitige, zugespitzte und abgerundete Pyramiden erzielte, die sich schnell in Äther lösen. Howard[2]) benutzte später konz. Kalilauge, in der er dünne Schnitte einen Augenblick erwärmte, worauf die Lauge sofort entfernt wurde. Howards Annahme, daß die Alkaloide in ähnlicher Kristallform zuweilen freiwillig im Parenchym auskristallisieren, wurde von verschiedenen Autoren widerlegt und Flückiger konnte ausgeschiedene Alkaloidkristalle an der ihm von Howard überlassenen Rinde nicht auffinden. Schacht[3]) und Wigand[4]) hatten die Ansicht vertreten, daß die Basen nur in den Bastzellen lokalisiert wären. Wigand färbte Schnitte mit Cochenille und da die Bastfasern sich im Gegensatz zu Lein- und Hanffasern stark färbten, so sollten die Alkaloide in der Membran der Bastfasern ihren Sitz haben. Wurde anderseits die Rinde mit heißem Wasser ausgezogen, im Auszuge der Gerbstoff mit Eisenchlorid gefällt und mit dem Filtrat, das als Alkaloidlösung angesprochen wird, Lein- oder Hanffaser imprägniert, so wurde von diesen jetzt Cochenille gespeichert. Die extrahierten Chinafasern färbten sich nicht. Nur kurze Zeit konnte sich diese Ansicht behaupten; sie wurde von Carl Müller[5]) auf makrochemischem Wege widerlegt. Rindenspäne wurden durch Schütteln mit „Eisendrahtspiralen“ und „reinem grobkörnigen Flußsand“ zerkleinert, so daß die Parenchymzellen zertrümmert, die Bastfasern aber unversehrt blieben. Das Pulver kam in eine Glasretorte, die mit einem Blasebalg in Verbindung stand und über eine eingeschaltete zweite Retorte in ein mit Wasser gefülltes Gefäß führte. Nun wurde Luft eingeblasen und so wurden die feineren Parenchymfetzen in die Vorlage übergetrieben, während die Bastfasern zurückblieben. Die getrennten Massen wurden mit verd. Schwefelsäure erschöpft und aus den Auszügen die Basen amorph abgeschieden. Parenchym fast 10 %, Bastfasern 2 % Alkaloid. Der geringe Gehalt der Fasern wird durch die den Fasern anhängenden Reste von Parenchym bedingt. Diese Ergebnisse konnte Flückiger[6]) bestätigen, der ebenfalls Fasern und Parenchym trennte und zur Charakteristik die Elemente trocken im Reagensglase erhitzte. (Auftreten rotvioletter Dämpfe zeigt Alkaloid an, Grahesche Reaktion). Schließlich fand Carles[7]) die Fasern alkaloidfrei.

Auf makrochemischem Wege war die Lokalisation sicher gestellt. Zum mikrochemischen Nachweis bediente man sich allgemein der Kalilauge (sie

[1]) C. A. J. A. Oudemans, Aanteekeningen der Pharmakopoea neerlandica, Rotterdam 1855, S. 221.

[2]) J. E. Howard, Quinology of the East Indian Plantations, 1869, S. 33.

[3]) H. Schacht, Anatomie u. Physiologie der Gewächse, Berlin 1856, I, S. 400.

[4]) A. Wigand, Welches der Hauptzellenelemente ist als Sitz der Alkaloide anzusehen? Bot. Ztg., 1862, I, S. 137.

[5]) Carl Müller, Untersuchungen über den Sitz der Alkaloide in der Cinchonarinde, Jahrb. f. wiss. Bot., 1866, V, S. 238.

[6]) F. A. Flückiger, Beiträge zur Anatomie der Chinarinden, Schweiz. Wochenschr. f. Ch. u. Ph., 1866, IV, S. 361.

[7]) Carles, Journ. de Pharm. et de Chim., 1873, XVI, S. 22.

wurde auch von Vogl[1]) vielfach benutzt), doch war man mit ihrer Hilfe noch nicht auf die Lokalisation eingegangen. Erst Parfenow[2]) beschäftigte sich hiermit eingehend und fand die Basen nur im Inhalte des Parenchyms und der Saftröhren. Kurze Referate dieser Dissertation brachten C. Müller (Justs Jahrber., 1887) und Tschirch (Bot. Ztg., 1885, S. 52). Letzterer beschäftigte sich bald darauf selbst mit der Lokalisation (Tagebl. 60. Naturforsch.-Vers., Wiesbaden) und untersucht hauptsächlich das Wundparenchym; er sagt: „Ich habe auch festgestellt, daß die Chinaalkaloide vornehmlich im Phloemparenchym vorkommen (was übrigens nur die Angaben Flückigers, N. J. C. Müllers und Carles' bestätigte, resp. präzisierte) und daß auch das Wund-Rindenparenchym besonders alkaloidreich ist[3]).“

Aus der besprochenen Literatur geht hervor, daß Carl Müller (nicht N. J. C. Müller und nicht Flückiger) als erster makrochemisch den Sitz der Basen ins Parenchym verlegt, Parfenow[4]) mikrochemisch mit Hilfe der Kalilauge.

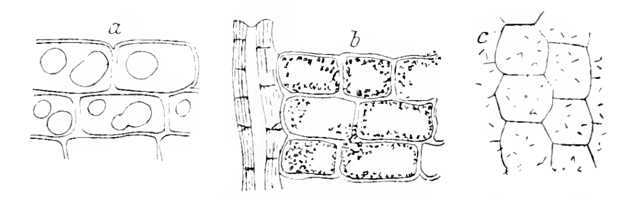


Fig. 86. Cinchona calisaya (Rinde, Droge); Alkaloidfällungen a) mit Kalilauge, b) Brombromkalium, c) Kaliumferrocyanid.

Sonderbarerweise wird ganz allgemein zum Nachweis in der Droge (Chinarinden) die Howardsche Methode mit mehr oder weniger verd. Kalilauge angegeben. Die Reaktion ist aber nicht klar und liefert, selbst beim sofortigen Auswaschen mit Wasser (zur Entfernung des Karbonates), nur selten Kristalle. Von 22 an verschiedenen Rindenstücken ausgeführten Reaktionen habe ich nur viermal die in der Literatur angegebenen Kristallnädelchen (Tschirch, Anat. Atlas, S. 35) erhalten. Beim kurzen Erwärmen mit Kalilauge werden Schnitt und Flüssigkeit grünlich, beim Auswaschen mit Wasser schlägt die Farbe in Rotbraun um; es bilden sich in den Parenchymzellen und über diesen, doch stets im Schnitte, große dunkle Tropfen, die bei gekreuzten Nicols nicht aufleuchten. Nach 10—12 Stunden sind die Tropfen zum Teil in undeutliche, schwach leuchtende Sphärokristalle

[1]) A. Vogl, Chinarinden 1867, Beitr. z. Pflanzenanatomie, 1869.

[2]) Ilfa Parfenow, Chemisch-pharmakognostische Untersuchung der braunen amerik. Chinarinden aus der Sammlung d. pharm. Inst. Dorpat, Dissertat., 1885.

[3]) A. Tschirch, Angewandte Pflanzenanatomie, 1889, S. 130.

[4]) Vergl. C. Müller, Justs Jahrb., 1887, II, S. 565.

übergegangen (Fig. 86a). Die Sphärokristalle hält Parfenow für Chinin, die dendritischen und spießigen Formen, die man nicht immer erhält, für Chinidin. Bessere Erfolge erzielt man auf einfachere Weise beim Einlegen der Schnitte in ein Gemisch von Glyzerin und Kalilauge (A. Meyer[1])). Die Kristallisation (Sphärokristalle) erfordert jedoch längere Zeit. Karbonatausscheidungen werden durch Verkitten des Deckglases verhindert.

Bei der Reaktion mit alkoholischem Ammoniak (Oudemans), die stets Kristalle liefert, sind gleichzeitige Fällungen von Pflanzensäuren nicht ausgeschlossen. Am brauchbarsten erscheint mir neben Jodjodkalium in erster Linie Brombromkalium, wenn man dünne Längsschnitte, die sich aus der Rinde sehr leicht herstellen lassen, verwendet (Fig. 86b). Mit Säuredämpfen schlugen die Reaktionen fehl (Salzsäure färbt die Bastfasern violett). Kaliumdichromat gibt nur amorphe Klumpen. Hingegen erhält man stets und sofort sehr feine Kriställchen, die im polarisierten Licht silbergrau aufleuchten, wenn man die Schnitte in Kaliumferrocyanid legt und nach einigen Augenblicken etwas verd. Salzsäure zusetzt (Fig. 86c). Die Kristalle sind aber überwiegend nicht im Präparate. Die meisten Reaktionen werden durch die Phlobaphene beeinträchtigt.

In den Auszügen wies Behrens[2]) die Basen nach. Seine Methode wurde von van Leersum[3]) verbessert und einfacher gestaltet. 0,001 g mit Ammoniak durchfeuchtetes Rindenpulver wird mit 2 ccm warmem Benzol oder Chloroform extrahiert; der Auszug wird zur Trockne gebracht, der Rückstand in Essigsäure aufgenommen. In dem Verdampfungsrückstand dieser Lösung wird Chinin mit Natriumtartarat, Kaliumoxalat oder Kaliumchromat nachgewiesen. Außerdem kann nach erfolgter Kristallisation die Mutterlauge entfernt und das Chinin als Herapathit bestimmt werden[4]). Die Reaktionen gelingen stets, falls der Chiningehalt relativ hoch ist. Sind größere Mengen von Cinchonidin anwesend, so müssen diese zuvor entfernt werden.

[1]) A. Meyer, Wissenschaftl. Drogenkunde, 1892, II, S. 158.

[2]) H. Behrens, Anleitung z. mikr. Analyse, III. Heft, S. 101.

[3]) P. van Leersum, Mitteilungen über mikrochemische Untersuchungen, Mededeel v. d. Lab. d. Gouv. Kina ond., Bataria, 1905.

[4]) Eine Lösung von Chininsulfat in Essigsäure gibt nach dem Aufkochen mit einer mit Schwefelsäure angesäuerten, gesättigten alkoholischen Jodlösung stark polarisierende Kristalle von schwefelsaurem Jodchinin (Herapathit). Nach Behrens und Emich kann die Reaktion am Objektträger ausgeführt werden. Man mischt aus Wasser, Alkohol und einer Spur Schwefelsäure einen langen Tropfen, bringt in das eine Ende etwas Jod, in das andere die Substanz und läßt den Objektträger 5—20 Minuten unter einer Glocke liegen.

Die Herstellung der Auszüge kann umgangen werden durch Sublimation. Wir sublimieren etwas angefeuchtetes Pulver auf der Asbestplatte und benutzen eine 5 cm hohe Flamme, deren Spitze die Asbestplatte berührt. Alle Minuten wird ein neuer Objektträger aufgelegt, nach 6 Minuten ist die Sublimation beendet. An einigen der Sublimate bemerken wir einen starken rötlichen Schein, vorzüglich die Kanten der Objektträger sind gerötet (Grahesche Reaktion). Die anderen Beschläge zeigen erst nach 15—20 Stunden Kristallbildung (Fig. 55, S. 210), geben die allgemeinen Alkaloidreaktionen, mit verd. Schwefelsäure eine blau fluoreszierende Lösung und können nach Behrens und van Leersum weiter geprüft werden.

Bei lebendem Material empfahl Lotsy[1]) zum Nachweis in der Zelle ebenfalls Jodjodkalium als bequemstes und doch sicheres Reagens. Herder (s. S. 46 der auf S. 288, 3 angeführt. Diss.) gebrauchte, in 30% wässeriger Chloralhydratlösung gelöst, Caesiumquecksilberjodid (Empfindlichkeitsgrenze für Chinin 1 : 20000, für Cinchonin 1 : 10000) und Baryumquecksilberjodid (Chinin 1 : 25000, Cinchonin 1 : 12000). Die Niederschläge treten bei lebendem Material deutlich hervor, doch besitzen die kleinen Kriställchen keine charakteristischen Formen. Lotsys Angaben über die Lokalisation wurden bestätigt. Eingehende Versuche mit Pikrinsäure stehen noch aus.

Coffea.

Über die Xanthinbasen in Coffea s. S. 310—313.

Corynanthe Yohimbe.

Der westafrikanische Yohimbe-Baum führt in den Blättern, mehr noch in der Rinde, mehrere Basen. Das Hauptalkaloid ist das Yohimbin (bis zu 1,3% in der Rinde), eine tertiäre Base, die in Nadeln kristallisiert, welche in Alkohol, Äther, Chloroform löslich sind; Schwefelsäure löst farblos. Das salzsaure Yohimbin kristallisiert in Wetzsteinformen. Die Nebenalkaloide (Yohimbenin u. a.) sind wenig erforscht (Spiegel, Siedler, Thoms u. a.).

Yohimbin wies Griebel[2]) nach, indem er den alkalischen Auszug des Rindenpulvers mit Äther ausschüttelte und mit dem Rückstand der Ätherausschüttelung die Reaktionen vornahm. Konz. Schwefelsäure löst farblos, bei Zusatz eines Körnchen Kaliumbichromat fließen blauviolette Streifen ab, die bald blaugrau, schließlich grünbraun werden. Erdmanns Reagens färbt dunkelblau, gelbgrün. Froehdes

---

[1]) P. Lotsy, De localisatie van het Alcaloid in Cinchona Calisaya en in C. succirubra, Mededeel van de Laboratoria des Gouvernements Kina onderneming, No. I, Batavia 1898.

[2]) C. Griebel, Zur Kenntnis und zum Nachweis der Yohimberinde, Ztschr. f. Nahr.- u. Genußm., 1909, XVII, S. 74.

Reagens dunkelblau, bleibend grün. Vanadinschwefelsäure dunkelblau, grün. Im Gewebe verfolgte Tunmann (Verh. Naturf.-Ges. Karlsruhe 1911, II 1, S. 313) die Basen. Bei dem getrockneten Rindenmaterial, welches zur Verfügung stand, war es zweckmäßig, die Schnitte zuvor mit Wasser einige Minuten auszuwaschen. Ein Teil des, die Reaktionen verdeckenden. Gerbstoffes wird derart entfernt. Erdmanns Reagens (mit Chloralhydrat, S. 268) färbt blaugrün, Vanadin- und Molybdänschwefelsäure färben blau, dann dunkelgrün. Die Färbungen treten klar hervor, wenn die Schnitte direkt in die Lösungen eingetragen werden, besonders bei Benutzung von Lampenlicht (ohne Einschaltung der blauen Scheibe). Jodjodkalium kann an dünneren Längsschnitten verwendet werden, der Niederschlag mit Brombromkalium ist sehr gut sichtbar. Die Basen sind nur in den Parenchymzellen und zwar ausschließlich im Zellinhalte lokalisiert. Ein postmortales Eindringen in die Membran findet nicht statt. Ob die Siebröhren Alkaloide führen, kann bei Drogenmaterial schwer entschieden werden. Durch hohen Gehalt zeichnen sich Markstrahlen und äußeres Rindenparenchym aus. Wundparenchym, in dem naturgemäß die alkaloidfreien Bastfasern fehlen, fallen sofort durch hohen Alkaloidgehalt auf. Die Verhältnisse sind bei Corynanthe die gleichen wie bei Cinchona, so daß man durch Erzeugung einer sog. „renewed bark“ eine alkaloidreichere Droge erzielen würde.

Uragoga ipecacuanha.

Die Ipecacuanha-Alkaloide sind wahrscheinlich Chinolinderivate (Pelletier und Magendie 1817, Paul und Cownley, O. Keller[1]) u. a.). In der Rio-Wurzel (Uragoga ipecacuanha Baill.) sind gefunden: 1,45% Emetin, 0,52% Cephaëlin, 0,04% Psychotrin, in der Cartagena-Wurzel (Urag. acuminata Karsten): 0,89% Emetin, 1,25% Cephaëlin, 0,06% Psychotrin. Emetin findet sich in den Wurzeln verschiedener Rubiaceen und Violaceen (Hybanthus ipecacuanha Taub.). Doch kommt es nicht in allen „Ipecacuanha-Wurzeln“ aus der Familie der Rubiaceen vor[2]). Nach Dohme[3]) treten die Basen auch im Stengel auf. Emetin ist amorph, die übrigen Basen kristallisieren. Näheres über Konstitution und physiologische Bedeutung fehlt.

In mikrochemischer Hinsicht liegt zunächst eine Angabe von Tschirch (Anat. Atlas, S. 38) vor; er sagt: „Da Pikrinsäure und Kaliumbichromat, besonders das letztere, vornehmlich in den innersten

[1]) Reaktionen isolierter Basen bei: Paul u. Cownley, Pharm. Journ., 1895 u. 1896, O. Keller, Arch. d. Pharm., 1911, CCXLIX, S. 512, Allen u. Scott-Smith, Chem. Centralbl., 1903, 1, S. 92.

[2]) C. Hartwich, Über eine Ipecacuanhawurzel aus Sao Paulo, Schw. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1911, XLIX, Nr. 40.

[3]) A. Dohme, Amer. journ. pharm., 1895, S. 533.

Teilen der Rinde (am Kambium) Fällungen hervorrufen, so scheint das Emetin vornehmlich dort seinen Sitz zu haben"; ferner: „0,5 g des Pulvers mit 2,5 ccm Salzsäure geschüttelt, gibt ein Filtrat, von dem ein Tropfen mit einem Körnchen Chlorkalk zusammengebracht eine charakteristische Rotfärbung gibt" (Emetin).

Boelling (S. 21 der auf S. 307 ang. Dissert.) stellte Vorversuche mit den Rohalkaloiden der Ipecacuanha an, die er nach der Vorschrift von Podwissotzki[2]) gewann, und erhielt folgende Reaktionen mit der Wurzel: Jodjodkalium, Chlorzinkjod, Joddämpfe, Kaliumdichromat. Kaliumwismutjodid erzeugen gelbbraune Fällungen im Rindenparenchym, Kambium und Siebteil. Diese Fällungen treten des Stärkegehaltes wegen wenig hervor, ebenso die durch Pikrinsäure, Platinchlorid (dunkelgelb), Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure (weißlich) erzeugten Fällungen. „Die Fällung von Kaliumquecksilberjodid und von Goldchlorid wird durch Nachbehandlung der Schnitte mit Schwefelwasserstoff sichtbar gemacht; die Goldchloridfällung tritt deutlicher hervor nach Reduktion zu metallischem Gold durch Einwirkung der Ferrosulfatlösung auf den von der überschüssigen Goldlösung durch Auswaschen befreiten Schnitt." Von Tunmann (Gehe Ber., 1912, S. 165) wurden benutzt Natronlauge (Cephaelin), Baryumquecksilberjodid mit nachfolgender Behandlung der Schnitte mit Kaliumdichromat, ferner ein Gemisch von 4 Tropfen Molybdänschwefelsäure und einem kleinen Tropfen rauchender Salzsäure, in welches die Schnitte nach dem Aufhören der Gasentwicklung eingetragen werden (Blaufärbung). Kaliumdichromat (s. oben) ist ohne Wirkung. Im Pulver erhält man Kristalle (sehr feine, gebogene Nadeln) mit angesäuerter Pikrinsäurelösung (5 g konz., wässerige Pikrinsäurelösung, 20 g Wasser, 0,5 g Salzsäure). Bei der Mikrosublimation von 0,07 g durchfeuchteten Pulvers erhält man bei 5 cm hoher Flamme nach 3—6 Minuten mehrere bräunliche Sublimate, in denen sich farblose bis schwach gelbliche Tropfen finden, welche 1—2 μ große kantige Gebilde führen, sowie über das gesamte Sublimationsfeld verteilt dunkle Körnchen. Die hellgelben Sublimationsballen reagieren mit Jodjodkalium (körniger Niederschlag), mit Eisenchlorid (blaugrün), verd. Kalilauge (feine Nadeln), Kaliumwismutjodid (brauner Niederschlag), Goldchlorid (Tropfen und Körner). Läßt man einen kleinen Tropfen Molybdänschwefelsäure vorsichtig auf das Sublimat auffallen (um Strömungen zu vermeiden), so gehen die Einschlüsse der gelben und sich in der Farbe nicht verändernden Sublimationsballen in tiefrote Tropfen über (Cephaelin). Sie lösen sich

[1]) Podwissotzki, Pharm. Ztschr. f. Rußland, 1880, Nr. 1 und Arch. f. exp. Path. u. Pharm., XI, S. 231.

ferner mit Molybdänschwefelsäure-Salzsäure (s. oben) blaugrün: dadurch unterscheiden sie sich von den dunklen kleinkörnigen Gebilden, die stets unregelmäßig zerstreut sind, nie in den hellen Ballen auftreten und sich mit gelber Farbe lösen (Emetin).

Nach Boelling ist der Sitz des Emetins in primärer Rinde, Kambium und Bastparenchym, nach Tunmann überwiegt Cephaelin im Phellogen und im äußeren Rindenparenchym, Emetin am Kambium und inneren Rindenparenchym. Doch kommen beide Alkaloide in den gleichen Zellen vor, nur nimmt der Emetingehalt nach außen zu ab.

Cucurbitaceae.

Citrullus colocynthis.

Die neuen Arbeiten von Power und Moore (Chem. and Druggist, 29. Jan. 1910) haben die Anwesenheit von Alkaloiden im Mark der Früchte von Citrullus colocynthis erwiesen. Wahrscheinlich kommen die von Braemer[1]) für den Colocynthin-Nachweis angegebenen Reaktionen diesem Alkaloide zu. Zum Nachweis dienten: konz. Schwefelsäure (blutrot), Froehdes Reagens (grünrot), Mandelins Reagens (blutrot, blauviolett). Die reagierenden Substanzen sollen in schlauchförmigen Idioblasten lokalisiert sein, welche einen halbflüssigen und feinkörnigen Inhalt führen und die Bündel (Siebröhren?) begleiten.

Campanulaceae.

Lobelia inflata.

Das Hauptalkaloid verschiedener Lobelia-Arten (L. inflata, purpurascens, nicotianifolia), das Lobeliin (1891, Siebert) ist eine gelbliche, dickflüssige, in Äther und Chloroform schwer, in Alkohol leicht lösliche Masse. Die Salze des Lobeliins kristallisieren.

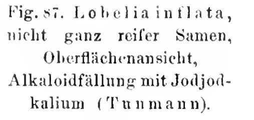


Fig. 87. Lobelia inflata, nicht ganz reifer Samen, Oberflächenansicht, Alkaloidfällung mit Jodjodkalium (Tunmann).

Bei orientierenden Untersuchungen erwiesen sich konz. Schwefelsäure, Froehdes und Erdmanns Reagens als ungeeignet, besser wirkte Vanadinschwefelsäure (Violettfärbung); am brauchbarsten war Jodjodkalium, welches einen aus kleinen rotbraunen Tröpfchen bestehenden Niederschlag hervorruft, der bald amorph wird und an — Schnitten ausbleibt. Die untersuchten Pflanzen waren (nach makrochemischer Prüfung) im kalten, regnerischen Juli 1912 (bot. Garten Bern) sehr alkaloidarm, so daß in den vegetativen Teilen der Nachweis mit Sicherheit nicht gelang. Hingegen

[1]) L. Braemer, Sur la localisation des principes actifs dans les Cucurbitacées, Compt. rend., 1893, CXVII, S. 753.

fanden sich relativ reichliche Mengen in den Integumenten und in der sich entwickelnden Samenschale (Fig. 87). Eine kristallinische Fällung (Platinchlorid) war auch im Samen nicht zu erzielen.

Compositae.

In einer großen Anzahl Compositen hat Greshoff[1]) makrochemisch Alkaloide ermittelt. Einige Basen sollen in glykosidischer Bindung auftreten (Achillein, Moschatin, Planta). Mikrochemisch sind die Compositen sehr dürftig bearbeitet. Verschaffelt[2]) macht einige Angaben über die Lokalisation des Echinopsins. Lutz[3]) hat einige Arten von Senecio bearbeitet. (S. vulgaris enthält nach Grandval und Lajoux bis 0,05% Senecionin und Senecin).

Glykoside.

Als Glykoside bezeichnen wir Pflanzenstoffe, die sich in eine Zuckerart (Glykosen, Rhamnosen, Galaktosen) und in einen zuckerfreien Körper (Aglykon) zerlegen lassen. Das Aglykon gehört nur selten der Fettreihe an (Jalapin, Convolvulin); es führt zuweilen Stickstoff (Blausäure-, Indikan-, Alkaloid-Glykoside) oder Stickstoff und Schwefel (Senfölglykoside). Die meisten Glykoside haben ein stickstofffreies Aglykon. Die Natur der Spaltlinge, besonders die des Aglykons, wird den chemischen Einteilungen zugrunde gelegt. Die Spaltung, die gewöhnlich unter Wasseraufnahme erfolgt, kann geschehen durch Kochen mit Wasser (selten), mit verd. Säuren oder Alkalien (in der Praxis) und durch Enzyme (in der Pflanze). Auch elektrische Ströme bewirken Spaltung, sowie Pilze und Bakterien, die jedenfalls spaltende Enzyme besitzen. Eine Anzahl Glykoside ist synthetisch hergestellt worden.

In der Zelle kommen die Glykoside, die im isolierten Zustande teils kristallinisch, teils amorph sind, in gelöster Form vor. Sie treten vorzugsweise in chlorophyllhaltigen (Blätter, Rindenparenchym) und parenchymatischen Zellen (Wurzeln) auf, fehlen auch nicht in Samen (Strophanthin, Oxymethylanthrachinone) und Früchten (Phloroglykotannoide), in Milchsäften (Apocynaceen, Asclepiadaceen) und in Sekretzellen (Convolvulaceen). Viele Glykoside sind mit Gerbstoffen, einige mit Harzen (Exogonium) gebunden. Die Gerbstoffglykoside bevorzugen Epidermis und äußeres Rindenparenchym. Die Glykoside werden in der Pflanze von Enzymen begleitet; beide Stoffe sind in der lebenden Zelle räumlich voneinander getrennt. Die Enzyme (s. d.) besorgen den Auf- und Abbau der Glykoside. In

---

[1]) M. Greshoff, Über das Vorkommen von Alkaloiden in der Familie der Compositen, Ber. d. pharm. Ges., 1900, X, S. 148.

[2]) E. Verschaffelt in: M. Greshoff, Echinopsine, eene nieuwe kristallyne plantenbasis, Versl. Kon. Akad. v. Wetensch, 1900, S. 688.

[3]) L. Lutz, Localisation des principes actifs dans les Seneçons, Bull. Soc. bot. France, 1895, XLII, S. 486.

ihrem Zucker besitzen die Glykoside einen Nährstoff: Pfeffer hat die Ansicht vertreten, daß die Glykoside als schwer diosmierende Stoffe zur Aufspeicherung von Zucker dienen. Für einige Glykoside (Vaccinium, Salix, Populus, Pirus) hat Weevers hierfür den Beweis experimentell erbracht. Das Aglykon bleibt in der Zelle, speichert am Tage den Zucker und bildet Glykosid, abends erfolgt Spaltung und in der Nacht wandert der Zucker ab. Ob dieser Befund für sämtliche Glykoside zutrifft, ist noch nicht sicher. Nach Russel sollen die Glykoside sich im Herbste in den basalen Teilen, vorzüglich in der Wurzel, ansammeln.

Die Glykoside kommen in den meisten Familien vor. Wahrscheinlich werden viele der von den Chemikern isolierten Körper in den Zellen ebenfalls in glykosidischer Form auftreten.

Der mikrochemische Glykosidnachweis ist nicht leicht. Er kann beide Spaltlinge benutzen. Der Nachweis mit Hilfe des glykosidischen Zuckers ist wenig klar. Tritt beim Zuckernachweis mit Fehling (S. 183 u. folg.) erst bei längerem Kochen Reduktion ein oder erfolgt die Naphtholschwefelsäurereaktion erst nach längerer Zeit, dann sind Hinweise auf Glykoside gegeben. Diese werden zuverlässiger, wenn freie Zucker nicht zugegen oder wenn die anwesenden Glykoside wasserunlöslich sind, die Schnitte mithin ein Wässern zur Entfernung freier Zucker und Gerbstoffe vertragen. Gewöhnlich wird der zuckerfreie Spaltling, das Aglykon, nachgewiesen. Denn die Reaktionen, die Säuren und Alkalien geben, kommen meist dem Aglykon zu, da gleichzeitig Spaltung erfolgt. Glykosid- und Aglykonreaktion decken sich fast immer. Nur in einigen Fällen geben Glykosid und Aglykon mit dem gleichen Reagens verschiedene Reaktionen. Morindin wird mit Alkalien oder Schwefelsäure rot, Morindon blauviolett. Salicin wird mit Eisenchlorid braun, Saligenin blau, Rhaponticin mit Schwefelsäure purpurrot, Rhapontigenin orangerot. Bei der Spaltung mit Säuren und Alkalien dringen die Spaltlinge meist aus den Zellen heraus. Die Spaltung mit Enzymen wäre weit vorteilhafter. Wässerige Enzymlösungen dringen schwer und nur langsam in die Zellen ein. Die Erfahrungen Bourquelots und seiner Mitarbeiter (im Journ. de Pharm. et de Chim.) müßten auf mikrochemischem Gebiete erprobt werden. Abtötung des frischen Materials mit heißem Alkohol (nur wenige Minuten), Anfertigung der Schnitte und Behandlung dieser oder auch frischer Schnitte mit Enzym bei Gegenwart wässerigen Alkohols würden wahrscheinlich bessere Resultate bringen.

Die meisten Glykosidreaktionen sind Farbenreaktionen. In einigen Fällen wird die Färbung besser lokalisiert durch Anwendung dampfförmiger Reagentien. Da das Aglykon verschiedenen Körperklassen angehört, so kann es nicht allgemein brauchbare Gruppenreagentien geben (wie bei den Alkaloiden). Brauchbare Reagentien werden die

Natur des Aglykons berücksichtigen. In vielen Fällen werden Schwefelsäurereagentien und Alkalien benutzt.

Adonidin.

In Adonis vernalis ist 0,2 % Adonidin (kristallinisches, in Wasser und Äther kaum lösliches Pulver) gefunden, das ein Glykosid sein soll.

Vanderlinden (Lit. S. 286, 1) gibt folgende Reaktionen an: Jodjodkalium (braun), Kaliumquecksilberjodid (gelbgrau), Tannin (grau), Phosphormolybdänsäure (blaßgelb, blau werdend), Goldchlorid (gelblich, dann schwarz). Konz. Schwefelsäure färbt rot. Diese Reaktion tritt am schärfsten in der Epidermis der Schuppenblätter der Basalknospen ein. Wahrscheinlich liegt ein glykosidisches Alkaloid vor.

Aus Adonis aestivalis hatte Kromer ein amorphes Adonidin hergestellt. Mikrochemisch lassen sich weder Alkaloide noch Glykoside nachweisen.

Aesculin.

Aesculin (Aesculinsäure, Minor, 1831) bildet glänzende feine Nadeln, die schwer in kaltem Wasser und in kaltem Alkohol, leicht in heißem Wasser und heißem Alkohol löslich sind. In Ammoniak und in Salpetersäure lösen sie sich mit gelber Farbe. Die gelbe Lösung in Salpetersäure wird auf Zusatz von Ammoniak rot. Die wässerige Lösung fluoresziert, selbst in starker Verdünnung, intensiv blau. Bei der Hydrolyse (verd. Säuren, Emulsin, Erhitzen auf 230°) entstehen Glykose und Aesculetin (Dioxycumarin). Letzteres, welches im Samen von Euphorbia lathyris vorkommt, stellt feine Nadeln dar, die ähnliche Lösungsverhältnisse wie Aesculin besitzen und sich in ätzenden Alkalien mit gelber Farbe lösen. Ihre wässerige Lösung fluoresziert weniger stark wie Aesculinlösung und wird mit Eisenchlorid grün. Aesculin ist in der Rinde von Aesculus hippocastanum besonders reichlich im Frühjahr vorhanden, weniger im Samen und in den Blättern. Gleichzeitig ist ein spaltendes Enzym zugegen (Aesculase). Goris[1] hält es für keinen Reservestoff; nach Sigmund[2]) soll es die Aufgabe haben, giftige Stoffwechselprodukte durch Bindung von Zucker in eine unschädliche Form überzuführen. Die Bildung ist vom Licht unabhängig (Weevers)[3].

Mit dem mikrochemischen Nachweis hat sich am eingehendsten Goris beschäftigt. Die Schnitte gelangen auf 10 Minuten in Bleiazetatlösung, werden ausgewaschen, dann zur Entfernung der Kohlensäure aufgekocht und in 10 % Jodkaliumlösung eingetragen. Zwar werden

[1]) A. Goris, Rech. microch. sur quelq. glucosid. et quelq. tannins végét. Paris, Thèse 1903.

[2]) W. Sigmund, Natur.-med. Verein Lotos, Chem. Ztg., 1911, S. 65 und Sitzb. Wien. Ak., 1910, CXIX.

[3]) Th. Weevers, Untersuchungen über den Glykosidgehalt der Pflanzen in Verbindung mit dem Stoffwechsel der Pflanzen, Pharm. Weekbl., 1902, XXXIX, S. 57.

die Aesculinzellen schwarzbraun, da aber das ganze Präparat eine mehr oder weniger starke Braunfärbung annimmt, so ist diese Reaktion wenig klar. Weit besser wirkt eisenhaltige Salpetersäure und Ammoniak. Doch gibt Goris eine umständliche Bereitungsweise der eisenhaltigen Salpetersäure an. Zunächst wird 1.0 g Eisendraht in 20 ccm verdünnter Salpetersäure gelöst. Von dieser Lösung werden 40 bis 45 Tropfen portionsweise 300 g konz. Salpetersäure zugesetzt. Nach jedem Zusatz wird die Wirkung der Säure an Schnitten von, im Dunklen gewachsenen, jungen Kastanienzweigen ausprobiert. Die Säure enthält genügend Eisen, wenn die Schnitte nach kurzem Verweilen in der Säure bei nachfolgendem Einlegen in Ammoniak tiefrot werden. Gute Resultate erzielt man bei Aesculus hippocastanum, Pavia ruba und Gelsemium. Die Zuverlässigkeit dieser Reaktion wurde von Cazzani[1]) in Frage gestellt, nach dem Gerbstoffe (Tannin) ebenso wie Aesculin reagieren. Auch muß erwähnt werden, daß Aesculin in Gelsemium sempervirens (Wurzel, von Sonnenschein angegeben) nicht auftritt und die Fluoreszenz von Gelsemium auf Gelseminsäure beruht (S. 404). Die direkte Sublimation liefert keine brauchbaren Resultate. Reines Aesculin kann allerdings unzersetzt sublimiert werden, oft findet Spaltung statt und das Sublimat besteht fast nur aus Aesculetinnadeln. Diese finden wir (aber nicht zahlreich und nicht immer) in den aus aesculinhaltigen Schnitten erhaltenen Sublimaten (s. Gelseminsäure).

Aesculin tritt auf in der Epidermis, in Trichomen, Endodermis, Markparenchym, in der Rinde im Pericykel, in der Wurzel im Bastparenchym (Goris): es erscheint in den jungen Schößlingen, dann in der Plumula: die Kotyledonen von Aesculus führen kein Aesculin (Weevers).

Anthocyane.

Blaue und rote Farbstoffe, die im Zellsaft gelöst (überwiegend) oder als Ausscheidungen (selten) auftreten, faßt man als Anthocyane (Cl. Marquardt, Farben der Blütenpflanzen, 1837) zusammen. Besonders reichlich treten sie in Blüten[2]) (Campanula, Malva, Paeonia, Vinca, Delphinium) und Früchten (Vitis, Fragaria, Vaccinium, Ligustrum, Rubus, Ribes) auf, dann in Stengeln, Knospen und Blättern; sie finden sich auch in sehr jungen Wurzeln der Crassulaceen[3]). Chemisch

[1]) E. Cazzani, Kritische Bemerkungen über den Aesculinnachweis von Goris; s. Ref. von E. Küster, Ztschr. f. wiss. Mikrosk., 1904, XXI, S. 390.

[2]) E. Paasche, Beitr. z. Kenntn. d. Färb. u. Zeich. d. Blüten und d. Verteilung von Anthocyan und Gerbstoff in ihnen, Diss. Göttingen, 1910.

[3]) Chartier et Colin, Sur l'anthocyane des plantules de Crassulacées, Rev. gén. Bot., 1911, XXIII, S. 264.

sind die Anthocyane, die sich leicht zersetzen, noch wenig erforscht. Die Farbstoffe lassen sich leicht mit Wasser ausziehen. Je nachdem die Lösung sauer oder alkalisch reagiert, erscheint sie rot, violett, blau, blaugrün bis gelbgrün. Durch Alkalien wird Anthocyan grün. Diese Grünfärbung ist teils eine spezifische Eigenschaft des Anthocyans, teils soll sie durch anwesende Gerbstoffe (Pflanzensäuren?) bedingt werden. Hansen[1] hatte sich auf Grund vergleichender spektroskopischer Untersuchungen für die Identität des blauen und roten Farbstoffes ausgesprochen. Durch Zusatz von Eisenvitriol oder Alaun zur Düngung läßt sich die rote Farbe von Hydrangea hortensis in Blau überführen (Molisch)[2]. Die Blüten von Myosotis dissitiflora sind bei niederer Temperatur rot, bei höherer Temperatur blauviolett oder blaßblau und die Blüten von Ipomoea rubrocoerulea sind bei höherer Temperatur himmelblau, bei niederer violettrot (Hildebrand)[3]. Nach Fitting[4] sind Erodium-Blüten bei niederer Temperatur blau, bei höherer rosa, bei sehr hoher Temperatur farblos. Die mit Chloroform oder Wasserdampf abgetöteten Blüten zeigen die gleichen Farbenumschläge. „Auch die in Wasser gelösten Rückstände der Alkoholextrakte aus den Blüten zeigen entsprechende reversible Farbenänderung bei Erwärmung.“ Doch liegen jedenfalls Gemenge verschiedener Körper vor, wie bereits N. J. C. Müller[5]) nachzuweisen versuchte. Wahrscheinlich sind es stickstofffreie Glykoside. Malvaceenanthocyan wird durch Salpetersäure und übermangansaures Kali völlig zerstört, durch Schwefelsäure wird das Molekül gesprengt, aber nicht die Chromogengruppe. In neuerer Zeit wurden 2 Komponenten isoliert, eine kristallisierende, sehr labile und eine amorphe, glykosidische (Grafe)[6]).

Anthocyan bildet sich unabhängig vom Lichte. Nur bei Syringa persica ist die Anthocyanbildung vom Lichte abhängig (Karzel). Bei der Entwicklung der Anthocyane findet gleichzeitig eine andere Ausbildung und Verteilung der Nährstoffe statt (Tischler)[7]), die Zunahme der Glykoside und des Zuckers ist mit einer Abnahme an Dextrin verbunden (Combes)[8]). Das Verschwinden des Anthocyans aus den jugendlichen Blättern ist von einem Sauerstoffverbrauch be-

[1]) A. Hansen, Die Farbstoffe der Blüten und Früchte, Verh. Würzburger phys. med. Ges., Neue Folge, Bd. XVIII, 1884.

[2]) H. Molisch, Der Einfluß des Bodens auf die Blütenfarbe der Hortensien, Bot. Ztg., 1897, LV, S. 49.

[3]) F. Hildebrand, Einige biologische Beobachtungen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1904, XXII, S. 473.

[4]) H. Fitting, Über eigenartige Farbenänderung von Blüten und Blütenfarbstoffen, Ztschr. f. Bot., 1912, IV, S. 81.

[5]) N. J. C. Müller, Spektralanalyse d. Blütenfarben, Jahrb. f. wiss. Bot., 1887, XX, S. 78.

[6]) V. Grafe, Studien über das Anthocyan, Sitzber. Wien. Akad., 1906, CXV, Abt. 1, S. 975—993 und 1911, CXX, Abt. 1, S. 765.

[7]) G. Tischler, Über die Beziehungen der Anthocyanbildung zur Winterhärte der Pflanzen, Beih., Bot. Centralbl., 1905, XVIII1, S. 452.

[8]) R. Combes, Biochem. Unters. über die Entwicklung des Anthocyans bei den Pflanzen, Compt. rend., 1909, CXLVIII, S. 790.

gleitet, der den normalen weit übersteigt. Die Anthocyane dienen Blüten, Früchten und Samen als Lockmittel; jugendlichen Pflanzenteilen dienen sie zum Schutz für das in Bildung begriffene Chlorophyll, indem sie strahlenabsorbierend und dadurch erwärmend wirken (Stahl[1]). Der Grund der herbstlichen Anthocyanbildung ist noch nicht völlig klargelegt[2]).

Anthocyan kommt meist im Zellsaft gelöst vor, doch soll es nach Karzel[3]) auch an Kugeln und an ähnliche Gebilde (Vakuolen?) gebunden sein. Overton[4]) sah im Mesophyll von Lilium martagon schwarzrote kuglige Bildungen, Hildebrand[5]) dergleichen bei den Blüten von Tillandsia amoena, Amorpha fructicosa, Gilia tricolor, Verbena chamaedrifolia. Außerdem treten bereits in den lebenden Zellen neben dem violetten Zellsaft blaue, blauschwarze und violette Ausscheidungen auf (Zimmermann)[6]). Häufig trifft man violette Ausscheidungen in der Epidermis der Blumenblätter der Delphinium-Arten. Die Ausscheidungen haben ganz verschiedene Formen. Man trifft in dem violetten Zellsaft kleine zarte Nadelsterne, strauchartig verzweigte Nadelgruppen, runde körnige Gebilde, Nadeldrusen u. a. Wahrscheinlich zählen hierher die von Politis[7]) angegebenen „Cyanoplasten" von Billbergia (Perigon), die sich in Glyzerin, 1 % Essigsäure, 1 % Salzsäure, stark verd. Alkalien, Chloroform, Alkohol, Äther, verd. Alkohol und Wasser lösen. Ebenso sollen die von Tschirch[8]) angegebenen blauschwarzen Chromatophoren der Früchte von Coffea arabica nach Kroemer[9]) Farbstoffkristalle sein. In Coffea treten in der Epidermis neben rotem Zellsaft kuglige, wulstige Formen auf, in den subepidermalen Zellen Nadelsterne. Weitere Beispiele von amorphem und kristallisiertem Anthocyan in den leben-

---

[1]) E. Stahl, Über bunte Laubblätter, Ann. d. Jard. bot. d. Buitenzorg, 1896, XIII, S. 137.

[2]) M. Miyoshi spricht von Abfall- und Todesanthocyanbildung (Über die Herbst- und Trockenröte der Laubblätter, Journ. of Univ. of Tokyo, 1909, XXVII).

[3]) R. Karzel, Beitr. z. Kenntn. d. Anthocyans in Blüten, Öster. bot. Ztschr., 1906; ferner J. Friedel, Compt. rend., 1911, CLIII, S. 825.

[4]) E. Overton, Beobachtungen und Versuche über das Auftreten von rotem Zellsaft bei Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1899, XXXIII, S. 206.

[5]) F. Hildebrand, Anatomische Unters. über die Farbe der Blüten, Jahrb. f. wiss. Bot., 1863, III, S. 59.

[6]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik, 1892, S. 104 und Ad. Weiß, Sitzb. Wien. Akad., 1866, LIV1.

[7]) J. Politis, Sopra speciali corpi cellulari che formano antocianine, Atti r. ac. dei linc., 1911, XX, S. 828.

[8]) A. Tschirch, Violette Chromatophoren in d. Fruchtsch. d. Kaffee, Schw. Wchschr. Ch. u. Ph., 1898, XXXVI, S. 452.

[9]) K. Kroemer, Angebl. Vorkommen v. violetten Chromatophoren, Bot. Centralbl., 1900, LXXXIV, S. 33.

den Zellen (Fig. 88) verdanken wir Molisch. „Namentlich da, wo auf der Blumenkrone dunkle Flecke, Makeln, dunkle Adern auftreten, kann man mit einiger Wahrscheinlichkeit auf festes Anthocyan rechnen.“ Auch niedere Temperaturen begünstigen die Bildungen von Anthocyankristallen (Brassica oleracea, Begonia maculata). Anthocyanausscheidungen finden sich in: Pelargonium zonale (Sphärite), P. Odier hortorum, Rosa, Dianthus caryophyllus L. (Sphärite), Vitis sp., Antirrhinum majus, Anagallis arvensis (tiefblaue Nadeln und Sterne), Aquilegia atrata, Lathyrus heterophyllus (Büschel und Sterne), Cytisus laburnum (Klumpen), Medicago sativa, Hedysarum coronarium, Ononis Natrix, Nemophila sp., Baptisia australis, Erodium Manescari. Es ist erforderlich zu diesen Studien nur lebendes Material in toto trocken zu durchmustern. Wieder-

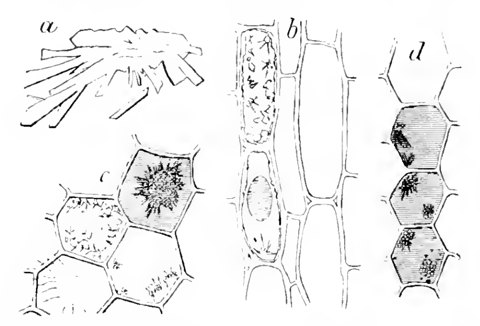


Fig. 88. Anthocyanausscheidungen in lebenden Zellen (Schnitte ohne Wasserzusatz). Ricinus communis, *a*) schwarzblaue Kristalle in subepidermalen Zellen, *b*) bläuliche Kristalle und rötliche Ballen in der Markperipherie. *c*) Digitalis purpurea. Epidermis der Flecke der Staubbeutel, stahlblau moosartige Gebilde und Klumpen von undeutlich kristallinischer Struktur. *d*) Klugia ceylanica, Epidermis der Blüte. (Tunmann).

holt habe ich gefunden, daß bereits bei Zutritt von wenig destilliertem Wasser im homogenen Farbstoff Klumpen, Ballen und fettartige Tröpfchen hervortreten, die schnell den Farbstoff speichern und so festes Anthocyan vortäuschen. Man zupft am besten mit der Pinzette die Epidermis ab und legt sie trocken unter Deckglas. Bei diesen Ausscheidungen benutzt man als Reagentien: 1 % Chromsäurelösung, frisch bereitete Eisenvitriollösung (1 : 10), basisches Bleiazetat und Alkalien, wodurch Farbenreaktionen erzielt werden.

Bekannt ist das Speicherungsvermögen der Zellwände für Farbstoffe. Auch Anthocyan wird bisweilen gespeichert. Immerhin tritt Anthocyanspeicherung selten ein. Naegeli und Schwendener[1]) fanden, daß der aus der Samenschale von Abrus precatorius extrahierte Farbstoff mit Anthocyan übereinstimmte und zeigten, daß der Farbstoff roter Blumenblätter farblose Membranen färbte.

---

[1]) C. Naegeli u. S. Schwendener, Das Mikroskop, II. Aufl., 1877, S. 504.

Zur Kristallisation des Anthocyans außerhalb der Zelle dienen als gutes Versuchsobjekt Blumenblätter von Pelargonium zonale (Molisch)[1]. Man hat nur nötig die Blätter unter dem Deckglas zu zerquetschen, damit der rote Zellsaft in Freiheit gelangt, den man langsam eindunsten läßt und so zur Kristallisation bringt. Mit Vorteil läßt sich auch Essigsäure benutzen, welche die Zellen abtötet, den Farbstoff aufnimmt und ihn beim Verdampfen in Form von feinen Nädelchen, Garben, Pinseln, Sphärokristallen von tief karminroter Farbe ausfallen läßt. Die schönsten Kristalle finden sich besonders unter dem Rande des Deckglases. Auch die Blätter des jederzeit zur Verfügung stehenden Rotkrautes (Brassica oleracea capitata) geben die Reaktion. Ebenso läßt sich 10% Salzsäure verwenden. Es ist aber unbedingt notwendig, dafür zu sorgen, daß die Verdunstung der Lösungen nur sehr langsam erfolgt. Erfolgte die Verdunstung innerhalb 2—3 Stunden dann erhielt ich nur schmierige Massen. Je langsamer die Verdunstung vor sich ging, um so schöner waren die Kristalle. Bei vielen Objekten läßt sich die Kristallisation aber auf keine Weise erzielen.

Zur Unterscheidung der Anthocyane von ähnlichen Farbstoffen empfehlen Buscalioni und Pollacci[2]) eine verdünnte gelbliche Lösung von Nikotin, in welche die Objekte eingetaucht werden. Nur Anthocyane verfärben sich hierbei und zwar ist der Farbenumschlag bei verschiedenen Pflanzen verschieden, grün (Tradescantia, Cissus, Chrysanthemum u. a.), blau (Canna, Hibiscus, Dahlia u. a.), violett (Salvia), gelbbraun (Tropaeolum).

Nach Combes[3]) hat der rote Farbstoff in den Blättern von Ampelopsis hederacea eine andere Zusammensetzung wie der sich im Herbst bildende. Ersterer läßt sich in purpurroten Nadeln isolieren und gibt mit neutralem Bleiazetat eine grüne Verbindung, letzterer, der hellbraune Nadeln darstellt, geht mit neutralem Bleiazetat eine gelbe Verbindung ein. Die Farbstoffkristalle lösen sich leicht in Alkohol, schwer in Wasser und sind in Äther, Benzol und Toluol unlöslich.

Eine Diatomee, Navicula ostrearia Gaill., führt (Lankester, Molisch)[4]) blauen Farbstoff und zwar soll der Farbstoff nach ersterem nicht in den Vakuolen sondern im Plasma lokalisiert sein. Nähere mikrochemische Angaben fehlen.

[1]) H. Molisch, Über amorphes und kristallisiertes Anthocyan, Bot. Ztg., 1905, LXIII, S. 145.

[2]) L. Buscalioni e G. Pollacci, Le Antocianine ed il loro significato biologico nelle piante, Atti dell' Ist. bot. Pavia 1903, N. S. VIII.

[3]) R. Combes, Untersuchungen über die Bildung der Anthocyanfarbstoffe, Compt. rend., 1911, CLIII, S. 886.

[4]) Näheres bei H. Molisch, Notiz über eine blaue Diatomee, Ber. d. bot. Ges., 1903, XXI, S. 23.

Anthrachinonglykoside.

Die Anthracenderivate kommen in den Zellen überwiegend in glykosidischer Bindung vor. Die Konstitution einiger von ihnen ist erst in neuerer Zeit erforscht worden, worüber die chemische Literatur einzusehen ist. Nativ sind diese Körper häufig als Mischglykoside vorhanden. Anthrachinonderivate (Emodine, Chrysophanol u. a.) treten zum Teil auch frei auf und begleiten die Anthraglykoside. Für einige Familien sind diese Glykoside typisch (Polygonaceen, Rhamnaceen, Leguminosen, Rubiaceen und Flechten). Gehaltsbestimmungen sind meist nur für praktische Zwecke an Drogen ausgeführt worden. Der Gesamtgehalt an Anthrachinonderivaten beträgt nach dem kolorimetrischen Verfahren von Tschirch und Edner in der Rinde von Rhamnus frangula über 3, Rh. purshiana 2,5, Rh. cathartica 0,4, in den Rheumrhizomen (Drogensorten) aus China 2,6—4,1, aus Frankreich 1,5, aus England 2%. Nach anderen Methoden werden weit geringere Werte erhalten. Bei Rhamnus frangula ist der Gehalt in Rinden (nach kolorimetrisch-kapillaranalytischen Vergleichsbestimmungen, ausgeführt an 2 cm dicken 3jährigen Zweigen von Sträuchern des gleichen Standortes) im August am niedrigsten (0,8%), im Februar-März am höchsten (1,72%), und fällt beim Austreiben (Tunmann)[1], so daß die Glykoside von Rhamnus mit dem Stoffwechselprozeß im Zusammenhang stehen und wahrscheinlich Reservestoffe darstellen.

Der mikrochemische Nachweis der Anthraglykoside gelingt derzeit nur mit Gruppenreagentien, Spezialreaktionen fehlen noch. Zum Nachweis dienen Alkalien, Ammoniakdämpfe und die Sublimation.

Mit Hilfe von Alkalien (Kalilauge, Ammoniak, Kalkwasser, Alkalikarbonate) ist die Lokalisation nur dann einigermaßen sicher zu erkennen, wenn man die Schnitte direkt in das Reagens einträgt und sofort beobachtet. Es entstehen violette und rötliche Farben. Nach einiger Zeit verteilt sich der Farbstoff über das ganze Präparat. Der Ausfall der Reaktion hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die Konzentration der Lösungen ist nicht ohne Bedeutung. In den vegetativen Teilen von Rheum wird man mit einer konzentrierteren Lösung besser fahren, in Wurzeln und Samen, auch in Drogen sind schwächere Reagentien (Kalkwasser) vorzuziehen. Allgemein gültige Vorschriften über die Stärke der Reagentien lassen sich nicht geben. Die Reaktion steht nicht nur im Zusammenhang mit der größeren oder geringeren Menge der Glykoside, sondern auch mit der Art ihrer Bindung. Bei Drogen und getrockneten Pflanzen sind die Färbungen stärker; sie treten auch schneller ein. Dies hat seinen Grund darin, daß die in der Zelle vorkommenden Anthraglykoside (Primärglykoside) sich beim Trocknen der Pflanzen leicht zersetzen (sekundäre Glykoside) und

[1]) O. Tunmann, Zur Kenntnis des Faulbaums und seiner Glykoside, Pharm. Zentralh., 1907, XLVIII, S. 99.

Aglykone frei werden. Letztere geben bereits mit schwachen Alkalien eine Färbung, während bei den Glykosiden zur Spaltung eine stärkere Lösung erforderlich ist.

Da die Reaktionen mit Alkalien nicht gut lokalisiert sind, ist es vorteilhafter Ammoniakdampf anzuwenden. Souèges legt in eine Petrischale ein Uhrglas mit der Wölbung nach oben, gibt soviel wässerige Ammoniakflüssigkeit hinein, daß der Boden der Schale bedeckt ist, legt auf das Uhrglas den Objektträger mit den Schnitten und bedeckt das Ganze mit der oberen Hälfte der Petrischale. In 2 bis 3 Minuten ist die Reaktion, die durch Erwärmen beschleunigt wird, vollzogen. Die Präparate werden in Paraffinöl untersucht. Souèges[1]) will seine Methode allgemein angewandt wissen. Hierzu ist zu bemerken, daß in den Fällen, in denen die Dämpfe kristallinische Niederschläge erzeugen sollen, die in Wasser löslich sind, ein hoher Exsikkator (Barth, S. 14) vorzuziehen ist. In den Petrischalen tritt leicht Wasser mit über. Auch sind bei der Dampfmethode die Befunde oft nicht klar (Rheum-Früchte). Liegen nämlich die Anthraglykoside in gerbstoffartiger Bindung vor, dann entstehen nur braune Färbungen. In solchen Fällen ist eine Kontrolle mit starker Lauge erforderlich. Überdies stehen die Reaktionen bei allen von mir untersuchten Objekten an Schärfe der Mikrosublimation nach.

Die Sublimation der Anthrachinone direkt aus dem Pulver der Anthrachinondrogen wurde von Mitlacher[2]) eingeführt (bei Benutzung von Uhrgläsern, S. 24) und erprobt an: Cortex Frangulae (Nadeln und Schollen), Rad. Rhei (Nadeln und strukturlose Massen), Cortex Rhamni purshianae („große strahlig kristallinisch erstarrte gelbe Massen") und Folia Sennae („kugelig erstarrte kristallinische Massen", die erst bei Resublimation Nadeln geben). Die Sublimate lösen sich in Alkohol, Chloroform, Äther, Toluol und Eisessig, in alkoholischer Kalilauge (kirschrot), wässeriger Kalilauge (rot), Soda (rötlichbraun). Ammoniak färbt schwach rot. Bei der Sublimation auf der Asbestplatte (höhere Temperatur) erhält man aus Senna aber sofort Nadeln; bei niedriger Temperatur lassen sich (Rheum) feine Nadeln (15—20 μ) erzielen, die völlig farblos sind (durchfallendes Licht). Welche Körper in den Sublimaten vorliegen, ist noch unbekannt, da sicheres Vergleichsmaterial nicht zur Verfügung steht. Mit Kalilauge habe ich nur eine unbeständige Verbindung in Wetzsteinform erhalten (s. Physcion).

[1]) R. Souèges, Anwendung gasförmiger Reagentien zur Charakterisierung der wirksamen Drogenbestandteile, Bull. scienc. pharm., 1911, XVIII, S. 526.

[2]) W. Mitlacher, Zur Mikrochemie einiger Emodindrogen. Pharm. Praxis, 1906, V, Nr. 11.

Jedenfalls sind zwei verschiedene Anthrachinone zugegen, ein in Soda löslicher und ein in Soda unlöslicher Körper. Die „Klumpen“ oder „Schollen“ bestehen nicht aus der gleichen Substanz wie die Nadeln; sie geben bei höherer Temperatur nur Sphärite, niemals Nadeln, wie Fig. 10 (S. 31) zeigt. Es muß jedoch betont werden, daß nicht sämtliche Anthraglykoside kristallinische Sublimate geben. Bei Rhamnus cathartica habe ich weder bei niederer noch bei höherer Temperatur, (auch nicht bei Resublimation) Kristalle erhalten, sondern nur amorphe gelbe Massen, die scharfe Reaktionen mit Alkalien gaben.

Schwefelsäure wird man nur beiläufig zum Nachweis anwenden; sie bewirkt eine kräftige (rote) Farbenreaktion, steht aber den Alkalien insofern nach, weil eine ziemlich konz. Säure benutzt werden muß, die das Gewebe rasch zerstört. Bei Rhamnus frangula darf nach O. Linde (Apoth.-Ztg., 1905) die konz. Säure höchstens mit 10 % Wasser gemischt sein, schwächere Säuren geben keine Reaktionen mehr.

Über die Lokalisation innerhalb der Zelle sprach sich zuerst Borscow[1]) aus; er vertrat die Ansicht, daß Frangulin in Rhamnus frangula an kleine Stärkekörner gebunden sei. Nach Tschirch[2]) ist. „wie es scheint, auch die Chrysophansäure des Rhabarberrhizoms und das Rhamnoxanthin der Frangularinde an Plastiden“ gebunden. Beide Autoren verlegen somit den Sitz in organisierte Bestandteile der Zelle. Doch schon vorher deutet Herrmann[3]) „einen feinkörnigen, gelblichen Inhalt“ in den parenchymatischen Zellen bei Rumex crispus als Chrysophansäure, bemerkt aber, daß sich in anderen Zellen „ein flüssiger, blaßgelber bis orangefarbener Inhalt“ findet, der die gleichen Reaktionen gibt. Diese blaßgelbe Färbung der Zellinhalte soll auf Einwirkung der Alkalien des Plasmas auf gelöste Chrysophansäure beruhen und Borscow führt die rötliche Färbung mancher Membranen in den Zweigen und Stämmen von Frangula auf ähnliche Vorgänge zurück. Eine Speicherung der Anthracenderivate in den Zellwänden habe ich mit Sicherheit nicht feststellen können, sie erscheint nicht wahrscheinlich. Im allgemeinen sind die Anthraglykoside und die sie begleitenden freien Anthracenderivate im Zellsaft gelöst. Bei Rheum-Arten, Frangula u. a. bedingen sie die blaßgelbe Färbung des Zellsaftes. Doch wird man unschwer beobachten, daß die Färbung bei längerem Liegen der Präparate in Wasser (Plasmolyse) stärker wird und daß völlig farblose Zellen ebenfalls, wenn auch schwächer als die gelben, auf Oxy-

---

[1]) El. Borscow, Beiträge zur Histochemie der Pflanzen, Bot. Ztg., 1874, XXXII, S. 17.

[2]) A. Tschirch, Angew. Pflanzenanatomie, 1889, S. 63.

[3]) O. Herrmann, Nachweis einiger organischer Verbindungen in den vegetabilischen Geweben, Dissertation, Leipzig, 1876.

methylanthrachinone reagieren. Wo die Glykoside in reichlicher Menge oder in gerbstoffartiger Bindung auftreten, da erscheint der Zellsaft dickflüssig und von dunkler Färbung. Bessere Erfolge gibt die Plasmolyse (3 Minuten lang) mit 4—5% Salpeter- oder Chlornatriumlösung (Goris und Crété). In außer Funktion gesetzten Geweben kommt es zur Klumpenbildung im Zellumen.

Auf „Frangulin" ging Borscow bei Rhamnus frangula und Herrmann bei Rh. cathartica ein. In Rh. cathartica fallen die Reaktionen sehr schwach aus, die karminrote Färbung nimmt in kurzer Zeit einen braunen Farbenton an. Am reichlichsten treten die Glykoside in den Markstrahlen auf, weniger in dem dünnwandigen Bast- und Rindenparenchym. In Rh. frangula wurden die Anthrachinone von Tunmann (a. a. O.) verfolgt: sie sind im Mesophyll der Blätter mit Sicherheit nicht nachweisbar (individuelle Schwankungen, schnelle Ableitung?), erst im Leitparenchym der Blattnerven; im Blattstiel: in den Markstrahlen und in den äußeren Elementen des Siebteiles; in jungen Zweigspitzen: im Siebteil, im Parenchym um die Schleimbehälter und selbst in den jugendlichen, noch unverdickten primären Bastfasern, aus denen sie aber bald schwinden; in der Droge: in der sekundären Rinde, im Parenchym (Phloem, Markstrahlen), ebenso in der Wurzel.

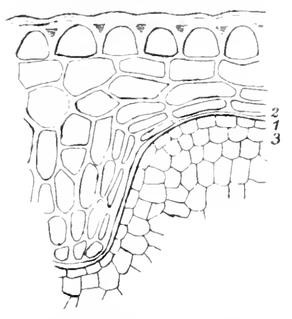


Fig. 89. Rheum undulatum (Frucht, Querschnitt). Schicht 1 (Samenschale) führt die Anthraglykoside, die innerste Schicht der Fruchtschale, 2, führt Spuren, die auch in Schicht 3 zuweilen auftreten (Tunmann).

„Chrysophansäure" verfolgte Borscow in Rumex obtusifolius und Physcia parietina und Herrmann in Rumex crispus und Squamaria elegans. Im Rhizom von Polygonum cuspidatum findet sich Polygonin (Emodinglykosid) im Bastparenchym, Markstrahlen und peripherem Mark, nicht in den Phloem- und Holzstrahlen (mit stark verd. Kalilauge, Goris und Crété[1]). In den Sennesblättern (Droge) treten die Reaktionen nur im zentralen Mesophyll ein, nicht in den Palisaden und in der Epidermis (Souèges). Bei Rheum ist die Lokalisation im Rhizom ohne weiteres ersichtlich (niemals in der Membran). In den Früchten von Rheum palmatum tanguticum fand Dye[2]) die Anthrachinone in der Samenschale, weniger in der Fruchtschale. Die gleiche

[1]) A. Goris et L. Crété, Sur la valeur purgative du Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc., Bull. scienc. pharm., 1907, XIV, S. 698.

[2]) C. A. Dye, Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen über die unterirdischen Organe von Valeriana, Rheum und Inula, Berner Dissert., 1901, S. 38.

Lokalisation fanden H. Miller und ich in Rh. rhaponticum, hybridum, undulatum, compactum, emodi, leucorrhizum u. a.; sowie bei Polygonum cuspidatum. In der Fruchtschale finden sie sich nur in der innersten Schicht (Fig. 89). Im Stengel, Blattstiel und Blattnerv von Rheum sehen wir Glykoside in vereinzelten Zellen des Markes und der Rinde und in subepidermalen Zellen.

Aloe.

Nach Macqret[1]) findet sich das Aloeharz nur in den großen Zellen des Pericykels der Bündel und nicht in den kleinen Endodermiszellen. Letztere enthalten nur Gerbstoffkugeln. Trägt man Blattstücke auf einige Tage in eine 10 $^0/_0$ Kaliumdichromatlösung ein, dann erscheinen nur die Zellen des Pericykels violett gefärbt. Der Inhalt des Pericykels löst sich ebenso wie die Handelsaloe in Alkohol. Molisch[2]) bringt das Aloin dadurch zur Kristallisation, daß er einen Safttropfen auf dem Objektträger mit etwas Glyzerin mischt und unter Deckglas einige Tage beläßt. Es entstehen Sphärite, die sich in Salpetersäure mit tiefroter, in Kalilauge und Ammoniak mit braungelber Farbe lösen: die Färbung geht bei Luftzutritt in Rot über. Bromdämpfe färben die feuchten Kristalle kirschrot. Oxydationsmittel (1 $^0/_0$ Chromsäure, Jod, Chlorkalk, verd. Eisenchlorid) färben den ausgeflossenen Saft und den in den Präparaten rot. Es muß aber bemerkt werden, daß der Aloingehalt unserer Gewächshauspflanzen sehr zu schwanken scheint. Bei bis 50 cm langen Blättern (A. arborescens) entstand mit Oxydationsmitteln nur ein bräunliches Gerinnsel, keine rote Färbung. Mit Glyzerin gelang eine Kristallisation mit verschiedenen Aloearten nicht: es trat nach 3—5 Tagen nur schwache Braunfärbung ein. Bei der Sublimation von Blättern, die makrochemisch bei Verarbeitung von 3 g Substanz die Borntraegersche Reaktion gaben, wurden nur geringe, amorphe, gelbliche Massen erzielt, die schwache Reaktionen geben.

Morindaglykoside.

Das Glykosid Morindin (in Morinda citrifolia, Rubiacee, Perkin, Hummel, Oesterle, Tisza, Arch. d. Pharm., 1908, CCXLVI, S. 150) ist unlöslich in Äther, Chloroform, Alkohol, Petroläther, sehr leicht löslich in Azeton, Eisessig, Essigsäureanhydrid und löst sich in Alkalien und in konz. Schwefelsäure mit roter Farbe. Es spaltet sich bei der Hydrolyse in Zucker und Morindon (Trioxymethylanthrachinon), welches sich in Alkalien und konz. Schwefelsäure blau-

[1]) M. G. Macqret, Le tissu sécréteur des Aloès, Journ. de Botan., 1888, II, S. 379 u.: Prollius, Arch. d. Pharm., 1884.

[2]) H. Molisch, Studien über den Milchsaft und Schleimsaft der Pflanzen, Jena 1901.

violett löst. Ferner sind in der Wurzelrinde zwei Dioxymethylanthrachinone gefunden worden; Morindadiol, löst sich in Alkalien orangefarben, in Schwefelsäure kirschrot, Soranjidiol, löst sich in Alkalien blauviolett, die Schwefelsäurelösung ist anfangs kirschrot, wird bald violett.

Präparate der Wurzelrinde von Morinda citrifolia werden durch Alkalien und Schwefelsäure dunkelrot und rote Streifen fließen ab[1]). Erwärmt man die Schnitte längere Zeit mit Kalilauge, so schlägt die rote Farbe in den Markstrahlen in Blau um, Morindonabspaltung. Die Morindinreaktion tritt in den Markstrahlen auch ein, wenn man aus den Präparaten Soranjidiol mit Äther, Morindadiol mit absolutem Alkohol entfernt hat. Präparate, denen Soranjidiol mit Chloroform, Morindin mit warmem Wasser entzogen ist, zeigen in den Geleitzellen Morindadiol durch orangegelbe Kalilaugefärbung an. Präparate, die wiederholt unter Deckglas mit Kalilauge ausgewaschen wurden (in der Kälte), zeigen bei nachfolgendem Erwärmen mit Kalilauge im Phloemparenchym eine geringe blaue Fällung. Soranjidiol. Morindin ist somit vorzugsweise in den Markstrahlen, Morindadiol in den Geleitzellen, Soranjidiol im Phloemparenchym lokalisiert. Auch der Steinkork enthält Oxymethylanthrachinone. Im Mikrosublimat gelang die Trennung der Körper nicht.

Rubiaglykoside.

Ruberythrinsäure bildet seidenglänzende gelbe Nadeln, die bei der Spaltung mit verd. Salzsäure eine Diose und Alizarin (1-2-Dioxyanthrachinon) liefern. Ruberythrinsäure ist das Hauptglykosid in Rubia tinctorum (Wurzel) und wird begleitet von Purpuringlykosid (sehr unbeständig, zerfällt in Glykose und Purpurin, 1-2-4-Trioxyanthrachinon, orangegelbe Nadeln) und Rubiadinglykosid (zerfällt in Glykose und Rubiadin, wahrscheinlich ein Homologes des Purpuroxanthins, gelbglänzende Nadeln).

Die Glykoside kommen in der Wurzel von Rubia tinctorum (Krappwurzel) im Zellsaft (Rinden- und Markparenchym, nicht in den Raphidenzellen) gelöst vor, dem sie eine gelbe Färbung verleihen. Die Lokalisation ist ohne weiteres in jedem Wasserpräparate zu erkennen. Naegeli und Schwendener[2]) geben an, daß bei alten Wurzeln auch die Membranen noch lebensfähiger Zellen die Glykoside führen; wahrscheinlich beruht die Speicherung auf einer Abtötung der Zellen durch zu starke Plasmolyse, die die Autoren bei ihrer Feststellung benutzen. An dem Berner Material waren die Membranen bei vorsichtiger Präparation stets farblos, die Membranspeicherung ist eine postmortale Er-

[1]) O. Tunmann, Z. Anatom. von Morinda citrifolia mit bes. Berücks. d. mikrochem. Verh., Pharm. Zentralh., 1908, XLIX, S. 1013.

[2]) C. Naegeli und S. Schwendener, Das Mikroskop, II. Aufl., 1877, S. 502.

scheinung. Die Glykosidgemische geben mit Alkalien purpurrote, mit Säuren orangefarbene bis dunkelgelbe Farbenreaktionen: Eisenchlorid färbt rotbraun. Durch Auswaschen der Schnitte mit warmem Wasser läßt sich die Ruberythrinsäure zum großen Teil entfernen: die mit den ausgewaschenen Schnitten angestellten Reaktionen weisen auf die Nebenglykoside hin. Eine Lokalisation ist dann nicht mehr zu erkennen.

Vorteilhafter als die Anwendung flüssiger Alkalien ist die Benutzung von Ammoniakdämpfen, wobei die purpurrote Fällung auf die Glykosidzellen besser beschränkt bleibt (Chemineau[1]), Russell)[2]). Außerdem kann bei lebendem Material die Plasmolyse herangezogen werden. Zur Kristallbildung kommt es hierbei nicht.

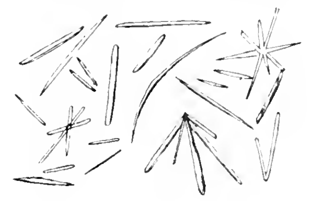


Fig. 90. Rubia tinctorum. Kristalle von Ruberythrinsäure im Mikrosublimat der Wurzel (Tunmann).

Bei der Sublimation[3]) eines kleinen Schnittes lebenden Materials erhält man farblose bis schwach gelbliche Nadeln (meist 15—20 μ lang), die einzeln oder zu kleinen Gruppen vereint liegen (Fig. 90). Konz. Kalilauge färbt rot, bei Wasserzusatz tritt Lösung ein. Kaltes Wasser löst nicht. Da die Kristalle sich leicht in warmem Wasser lösen, so sind sie Ruberythrinsäure. Alizarin, das rote Nadeln bildet und sich in lange gelagerten Wurzeln abscheidet, läßt sich aus altem Material ebenfalls unmittelbar aus Schnitten heraussublimieren. Wurzeln, die erst einige Wochen an der Luft liegen, besitzen noch kein Alizarin.

Physcion (Flechtenchrysophansäure).

Physcion[4]) (Hesse)[5]), Chrysophansäure (Rochleder und Heldt), Parietin (Thomson und Zopf), Physciasäure (Paternò), Chrysophyscin (Lilienthal) ist nach Oesterle und Johann[6]) Emodinmonomethyläther. Es ist von Hesse aus heißem Benzol, Alkohol oder Eisessig in glänzenden Blättchen erhalten worden und das einzige gelbe Produkt der Flechten, welches sich in Kalilauge, Natron-

[1]) R. Chemineau, Rech. microch. s. quelq. glukosid., Thèse 1903, Tours 1904, S. 33.

[2]) W. Russell, Recherches experimentales sur les principes actifs de la Garance, Rev. gén. de Bot., 1905, XVII, S. 254.

[3]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie von Rubia tinctorum, Pharm. Zentralhalle, 1912, LIII, S. 1178.

[4]) Physcion ist kein Glykosid.

[5]) O. Hesse, Über einige Flechtenstoffe, Liebig Ann., 1895, CCLXXXIV, S. 177.

[6]) O. Oesterle und U. Johann, Über die sog. Methylchrysophansäure, Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 476.

lauge und Schwefelsäure mit roter Farbe löst und ebenso wie Calycin und Pinastrinsäure ein gelbes Sublimat liefert. Es kommt überwiegend auf der Oberseite des Thallus vor und ist in und auf der Rindenschicht in Form kleiner Körnchen abgelagert. Die Bildung ist in erster Linie vom Substrat abhängig. Physcion wird als Exkret gedeutet, als Schutzmittel gegen Bakterien (Stahl)[1]) und Tierfraß (Zopf[2]), Bachmann)[3]) und ist für verschiedene Arten von Theloschistes (Xanthoria) und Calloplaca angegeben worden.

Der mikrochemische Nachweis (Senft)[4]) kann in Präparaten oder im Flechtenpulver nur geführt werden, wenn der Gehalt an Physcion ein hoher ist. Durch Zusatz von 10% Kalilauge erfolgt Rotfärbung und nachher Ausscheidung eines amorphen Niederschlages[5]). Konzentrierte Schwefelsäure bewirkt eine rote Lösung und nach einiger Zeit bilden sich am Rande des Deckglases 4—14 μ lange, kaum 0,5 μ breite und an beiden Enden zugespitzte Nadeln. Aus heißer Salpetersäure kristallisiert Physcion in gelben geraden Nadeln, die sich zu Rosetten vereinigen. Kalk- und Barytwasser lassen sich, wie schon Frank Schwarz[6]) zeigte, ebenfalls benutzen. Doch tritt die rote Färbung erst nach einigen Stunden ein, daher ist es ratsam das Deckglas mit Vaselin zu umziehen, um die Bildung kohlensaurer Alkalien auszuschließen, welche das Bild undeutlich machen.

Beim Erhitzen einer größeren Menge Flechtenpulver unter Deckglas in Paraffinöl kristallisiert Physcion in feinen gelben Nadeln aus, die in Büschel und Garben gruppiert sind. Ist der Physciongehalt der zu untersuchenden Flechten gering, dann wendet man die Mikrosublimation an (gelber Belag, der anfangs amorph ist und langsam in derbe gelbe Nadeln übergeht). Mit dem erhaltenen Sublimat lassen sich die eben angeführten Reaktionen ausführen. Die dabei entstehenden Niederschläge fallen natürlich in der Kristallform viel schärfer aus.

Ist der Gehalt an Physcion recht gering, dann stellt man zunächst Roh-Physcion durch Extraktion der Flechten mit Äther oder Chloroform

[1]) E. Stahl, Die Schutzmittel der Flechten gegen Tierfraß, Haeckel Festschrift, 1904.

[2]) W. Zopf, Zur biologischen Bedeutung der Flechtensäuren, Biolog Centralbl., 1896, XIV, S. 594.

[3]) E. Bachmann, Mikrochem. Reakt. auf Flechtenstoffe als Hilfsmittel Bestim. d. Flechten, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1886, III, S. 216 und Flora, 1887 LXXVIII, S. 291.

[4]) Em. Senft, Über das Vorkommen von Physcion in den Flechten und über den mikrochemischen Nachweis desselben, Wiesner Festschrift, 1908, S. 176

[5]) Reines Physcion gibt mit Kalilauge wetzsteinförmige Blättchen (unbeständig), die nach kurzer Zeit in scharf zugespitzte Nadeln übergehen.

[6]) Fr. Schwarz, Chem. bot. Studien üb. d. in d. Flechten vorkommenden Flechtensäuren, Cohns Beiträge, 1880, III, S. 249.

her und bringt das Lösungsmittel zur Verdunstung. Man kann seltene Flechten hierbei erhalten, indem man sie in toto auszieht. Mit dem Roh-Physcion, das aus dünnen gelben Blättchen besteht, werden die Reaktionen ausgeführt. —

In den Markhyphen von Nephoroma lusitanica gab Bachmann[1]) Emodin an, welches in Gestalt kleiner Kristallkörnchen der Membran aufgelagert ist. Es soll sich vom Physcion dadurch unterscheiden, daß es in Alkohol, Amylalkohol, Eisessig leicht löslich ist und von konz. Schwefelsäure safrangelb gelöst wird. Doch wird das Vorkommen von Emodin in Nephoroma von Hesse verneint.

Arbutin.

Arbutin (Vaccinin, Kawalier, 1852) bildet glänzende, bitter schmeckende Nadeln und Prismen, die zu Säulen und Tafeln verwachsen. Die Kristalle lösen sich unter Deckglas langsam in kaltem, schnell in warmem Wasser und in Alkohol. Bei der Hydrolyse (Emulsin, Weizenkeime, verd. Säuren) zerfällt Arbutin in Glykose und Hydrochinon. Die Handelsprodukte sind nicht rein. Ein relativ reines Produkt liefert Arctostaphylos aus Spanien (7 % Arbutin, das nur 5 % Methylarbutin enthält). Arbutin schmilzt bei 163°, wird dann fest und schmilzt nochmals bei 200°. Die Synthese wurde von C. Mannich (Arch. d. Ph., 1912, CCL, S. 547) ausgeführt. Arbutin kommt vor in Arctostaphylos uva ursi (in den Blättern bis zu 3,5 %), A. glauca, Gaultheria procumbens, Pirola rotundifolia (1 %), P. chlorantha, P. elliptica, Chimophila maculata, Vaccinium myrtillus, V. vitis idaea, Kalmia latifolia, K. angustifolia, Epigea repens, Grevillea robusta; es ist mithin ein für Ericaceen und Pirolaceen typisches Glykosid. Auch in Pirus communis ist Arbutin gefunden worden (Bourquelot). Begleitet wird Arbutin meist von dem Glykosid Methylarbutin (nicht in Grevillea robusta), welches bei der Hydrolyse Methylhydrochinon liefert, sowie von freiem Hydrochinon. Letzteres soll nach Hesse in Protea mellifera (Blüten) in Quantitäten bis zu 5 % auftreten, findet sich auch reichlich in den Blattknospen von Pirus communis.

Nach Weevers[2]) ist Arbutin ein Reservestoff (Pirus communis, Vaccinium vitis idaea), dessen Zucker beim Austreiben der Knospen im Frühjahr verbraucht wird, während das in den Zellen verbleibende Hydrochinon zur Neubildung von Arbutin dient.

Zum Nachweis des Arbutins im Gewebe läßt sich vorteilhaft Salpetersäure verwenden (Tunmann[3])). Die arbutinhaltigen Zellen nehmen sofort dunkelorange bis dunkelrotbraune Färbung an, werden aber bald leuchtend gelb bis chromgelb. Nach längerem Liegen der

[1]) E. Bachmann, Emodin in Nephoroma lusitanica, ein Beitrag z. Chem. d. Flechten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1887, V, S. 192.

[2]) Th. Weevers, Die physiologische Bedeutung einiger Glykoside, Extr. du Rec. d. trav. bot. Néerl., 1910, VIII.

[3]) O. Tunmann, Über Folia uvae ursi und den mikrochem. Nachweis des Arbutins, Pharm. Zentralh., 1906, XLVII, No. 46.

Präparate in Salpetersäure verblaßt die Färbung. Reines Arbutin reagiert in gleicher Weise mit Salpetersäure[1]. Da Arbutin in Alkohol nur wenig, in Äther gar nicht löslich ist, so kann man vor der Reaktion Chlorophyll und Fette durch längeres Behandeln der Präparate mit Ätherweingeist entfernen. Die Reaktion tritt mit großer Schärfe ein, die Färbung hält sich einige Zeit in Glyzerin und Glyzeringelatine. In den Blättern von Arctostaphylos uva ursi und von Kalmia latifolia fehlt das Glykosid in der Epidermis, im Holz- und Siebteil, in den Markstrahlen der Bündel, kommt aber in den Palisaden und noch mehr im Blattmesophyll vor. Im Blattstiel zeichnet sich vornehmlich das subepidermale Parenchym durch hohen Glykosidgehalt aus (Fig. 91). Die Arbutinzellen werden außerdem in vielen Fällen (Arctostaphylos, Kalmia) durch Vanillinsalzsäure stark gerötet. Hat man ein Präparat mit Vanillinsalzsäure behandelt, dann bewirkt Salpetersäure, den etwas abgespülten Schnitten zugesetzt, Überführung der roten Farbe in Chromgelb. Chemineau[2] zog zum Nachweis die Plasmolyse heran und Jungmann hat Phosphormolybdänsäure[3] in alkalischer Lösung empfohlen (Blaufärbung); die Reaktion ist jedoch nicht so brauchbar wie die mit Salpetersäure. Auch die Blaufärbung mit Eisenchlorid ist nicht empfehlenswert. Bei diesen Reaktionen ist das freie Hydrochinon ebenfalls mit beteiligt.

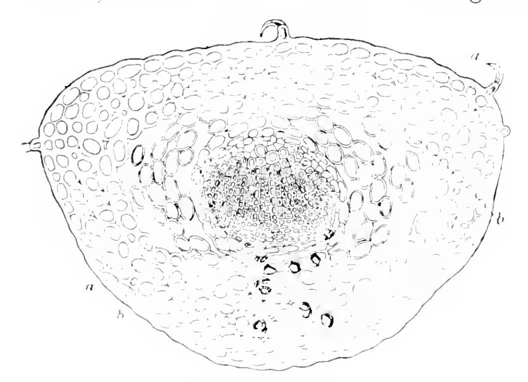


Fig. 91. Arctostaphylos uva ursi (Blattstiel, Querschnitt in Salpetersäure, einige Oxalate eingezeichnet). von *a* bis *b* Glykosidzone (Tunmann).

Der Arbutinnachweis von Fichtenholz[4] fällt nicht mehr in den Rahmen mikrochemischer Arbeiten. Die Verfasserin hydrolysiert wässerige Pflanzenauszüge mit Emulsin und stellt die optische Drehung der Auszüge vor und nach der Hydrolyse fest. Fehlingsche Lösung ist hierzu nicht anwendbar, da außer dem frei werdenden Zucker auch Hydrochinon reduzierend wirkt.

---

[1]) C. Reichard, Chem. Ztg., 1906, XXX, S. 65.

[2]) R. Chemineau, Rech. microchimiques sur quelques glucosides, Tours 1904, S. 95.

[3]) Phosphormolybdänsaures Natrium 0,5 g, Salzsäure 5 ccm, Wasser 15 ccm, Ammoniak 3 Tropfen.

[4]) A. Fichtenholz, Nachweis des Arbutins in den Pflanzen, Journ. de Pharm. et de Chim., 1908, XXVIII, S. 255.

Die Sublimation[1]) kann benutzt werden, wenn es nicht auf Lokalisationsermittelung ankommt. Freies Hydrochinon sublimiert ohne weiteres aus Schnitten und Pflanzenpulvern in diagnostisch brauchbarer Form. Arbutin wird vor der Sublimation auf der Asbestplatte hydrolysiert durch Mazeration der Schnitte mit verd. Salzsäure (einige Minuten) oder mit Emulsinlösung (10 Minuten). Die noch feuchten oder eingetrockneten Schnitte werden direkt sublimiert. Bei Benutzung von Säure führen die ersten Sublimate zuweilen Kristalle von Chlorammon. Im Sublimat ist das Hydrochinon meist in kleinen monoklinen Blättchen zugegen, daneben finden sich zarte Prismen und Zerrformen. Die sublimierten Kristalle lösen sich in Wasser, Alkohol, Äther, Anilin, Azeton, Ammoniak (rotbraun), Eisenchlorid (schwach grün). Aus der Anilin- und der Azetonlösung kristallisieren Prismen aus.

Die Vanillinsalzsäure-Reaktion kommt nicht dem Arbutin zu, die Arbutinzellen von Vaccinium myrtillus geben beispielsweise keine Rotfärbung[2]). Die Reaktion läßt sich aber zur Differentialdiagnose der offizinellen Folia uvae ursi von ihren Verwechselungen verwerten (Tunmann[3])), wie aus folgender Zusammenstellung hervorgeht. Quer- oder Längsschnitte werden in einen Tropfen Reagens eingetragen. Die Reaktionen treten innerhalb 1—2 Minuten ein und sind makroskopisch sichtbar.

Blätter von	Vanillinsalzsäure	Ferrosulfatlösung	
		Präparat	Lösung
Arctostaphylos uva ursa	rot	schwarz	blauschwarz
Buxus sempervirens	farblos	unverändert	farblos
Vaccinium vitis idaea	rot	dunkel	farblos bis schwach gelb
Vaccinium myrtillus	kaum gefärbt	bräunlich	farblos

Blausäure-Glykoside.

Der Blausäure wird eine hervorragende Bedeutung bei der Bildung von Eiweißstoffen zugeschrieben. Nach Gautier soll sie sich aus Salpetersäure

[1]) O. Tunmann, Der weitere Ausbau der Mikrosublimationsmethode und der Nachweis des Arbutins in Pflanzen, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1911, XXI, S. 312.

[2]) Der Gehalt an Arbutin in Vaccinium myrtillus muß sehr gering sein; zuweilen gelingt der Nachweis nicht, auch nicht makrochemisch mit 1 bis 2 Blättern.

[3]) O. Tunmann, Folia uvae ursi und ihre Verwechslungen, Pharm. Ztg., 1906, LI, S. 757.

(Nitraten) und organischen Substanzen bilden, Jorissen[1]) bringt sie mit der Bildung von Fruchtsäuren in Zusammenhang. Sie tritt teils frei (Pangium edule, P. ceramense, Hydnocarpus venenosa, H. alpina, Prunus javanica), teils in glykosidischer Form auf (Amygdalin in Prunusarten, Dhurrin in Sorghum, Phaseolunatin in Phaseolus lunatus, Gynocardin in Pangium edule). Die Bildung erfolgt in den Blättern. Nach Treub[2]) ist sie bei Pangium das erste Produkt bei der Stickstoffassimilation: nur die freie Blausäure soll im Phloem wandern (Ringelungsversuche). Bei Pfropfungen konnte Guignard[3]) einen Übertritt durch die Pfropfstelle nicht ermitteln. Blausäure soll zum Schutz gegen Tierfraß dienen (Treub), eine Ansicht, der Soave[4]) entgegentritt, und Verschaffelt (s. Senfölglykoside) fand, daß der Käfer Priophorus Padi am liebsten amygdalinhaltige Rosaceen frißt. An Wundstellen erfolgt Anhäufung an Blausäure[5]) (Treub u. a.).

Blausäure-Glykoside sind in über 40 Familien (Bixaceen, Compositen, Euphorbiaceen, Gramineen, Lineen, Papilionaceen, Passifloraceen, Ranunculaceen, Rosaceen, Calycanthaceen u. a.) verbreitet, treten oft in Begleitung von Saponinen auf (s. d.). Die Pflanzen lassen im unverletzten Zustande keinen Blausäuregeruch erkennen, doch entwickelt sich dieser nach Mirande[6]) sofort bei Nekrobiose (Einwirkung von Dämpfen von Quecksilber, Schwefelkohlenstoff, Anästhetika).

Der Nachweis hat mit der Beschaffenheit des Materials zu rechnen. Freie Blausäure nimmt beim Trocknen der Pflanzen infolge enzymatischer Prozesse um $^1/_5$—$^1/_2$ ab[7]). Doch auch glykosidische Blausäure verschwindet im Samen oft bei der Reife und aus Blättern meist vor dem Abfallen. Etiolierte Blätter führen nur Spuren (Prunus laurocerasus, gesunde Blätter hatten 0,1 % Blausäure, Schirmer, Pharm. Ztg., 1909, LIV, S. 593). Stark belichtete Pflanzenteile sind am gehaltreichsten.

[1]) A. Jorissen, Recherches sur la formation de l'acide cyanhydrique, Bull. Acad. roy. Belg., 1910, S. 224.

[2]) M. Treub, Sur la localisation, le transport et le rôle de l'acide cyanhydrique dans le Pangium edule Reinw., Ann. d. Jard. Buitenzorg, 1895, XIII, S. 1—89 u. Nouvelles recherches sur le rôle de l'acide cyanhydrique dans les plantes vertes, Ann. d. Jard. Buitenzorg, 1905, IV, S. 86 u. 1907, V, S. 79.

[3]) L. Guignard, Phys. Unters. üb. d. Pfropfung der Blausäurepflanzen, Ann. des Sc. nat. Bot., 1907, VI, S. 261.

[4]) M. Soave, Die blausäurebildenden Glykoside der Pflanzen u. der Verbrauch des Reservestickstoffes, Ann. Bot., 1906, V, S. 69.

[5]) Vergl. M. Greshoff, Über die Verbreitung der Blausäure im Pflanzenreiche, Arch. d. Pharm., 1906, CCXLIV, S. 665.

[6]) M. Mirande, Compt. rend., 1909, S. 140 u. L. Guignard, Compt. rend., 1909, S. 91.

[7]) E. Couperot, Compt. rend., 1909, CXLIX, S. 957 und: O. Walther, T. Krasnosselsky, N. A. Maximow, W. Malcewsky, Über den Blausäuregehalt der Bambusschößlinge, Bull. Dép. Agric. Ind. néerl., 1910, XLII, S. 512.

Der mikrochemische Nachweis der Blausäure muß unbedingt durch makrochemische Befunde ergänzt werden, vorzüglich bei nicht näher erforschten Pflanzen. Es gelingt dies mit geringem Aufwand an Material. Pflanzen, die cyanwasserstoffbildende Glykoside führen, entwickeln, wenn man sie zerquetscht und mit Wasser mazeriert, event. auf 30° erwärmt, Blausäuregeruch. Beim Fehlen der spaltenden Enzyme muß etwas Emulsinlösuug (Bereitung der Lösung s. Emulsin) zugefügt werden. Neben dem Geruch, der eines der besten Kennzeichen des Cyanwasserstoffes ist, benutzt man das Natriumpikratpapier von Guignard: Fließpapier wird mit 1 % Pikrinsäurelösung getränkt, dann mit 10 % Sodalösung behandelt. Das Papier ist gelb, Spuren von Blausäure färben es rot (Bildung von Isopurpursäure). Man kann auch die anderen makrochemischen Methoden benutzen (Guajaktinktur-Kupfersulfat, Rhodanatreaktion u. a.), doch ist das Guignardsche Verfahren das einfachste.

Zur Lokalisationsermittelung dient in erster Linie die Berlinerblau-Reaktion. Die Objekte gelangen zunächst auf einige Augenblicke (je nach der Stärke bis auf 1 Minute) in 5—10 % alkoholische Kalilauge (nach Treub: 2 Vol. 20 % wässerige Kalilauge + 8 Vol. 90 % Alkohol). Nach kurzem Abspülen kommen sie auf 2 bis 5 ev. bis 15 Min. in eine Eisenlösung (eine frisch bereitete und auf Siedetemperatur erhitzte Mischung von 2,5 % wässeriger Ferrosulfatlösung und 1 % wässeriger Ferrichloridlösung). Schließlich werden sie auf 5 Minuten in 20 % Salzsäure übertragen. Zur Ausführung lassen sich auch Schnitte benutzen. Vielfach wird die Benutzung kleinerer Stücke vorteilhaft sein; von den behandelten Stücken werden von den blau gefärbten Schnitträndern erst die Schnitte hergestellt. Zur makroskopischen Demonstration der Verteilung der Blausäure in Blättern werden die Blätter mit einer Bürste geklopft, und ihnen auf diese Weise möglichst viele kleine Wunden beigebracht. Die geklopften Blätter werden dann in toto der Berlinerblau-Reaktion unterworfen. Um die Wunden entstehen blaue Flecke. Ferner kann zum Nachweis eine 3 % wässerige Mercuronitratlösung[1]) dienen, die schnell ins Gewebe eindringt und von Peche[2]) bei Prunus laurocerasus erprobt wurde. Durch die Blausäure wird neben weißem, wasserlöslichem

[1]) Quecksilberoxydulnitrat ist leicht herzustellen, indem man in einem Präparatenglase 1 Teil Quecksilber mit 1,5 Teilen Salpetersäure (25 %, offizinelle) einige Tage stehen läßt. Es kristallisieren farblose Tafeln und Säulen aus. Millons Reagens ist eine oxydhaltige Lösung von Quecksilberoxydulnitrat.

[2]) K. Peche, Mikroch. Nachweis der Cyanwasserstoffsäure in Prunus laurocerasus, Sitzb. Wien. Akad., 1912, CXXI, S. 33.

Mercuricyanid metallisches Quecksilber ausgeschieden, welches im mikroskopischen Bilde sofort als schwarzer Niederschlag erscheint. Gerbstoffe sollen erst „nach längerer Einwirkung" des Reagens gelbbraun werden. Die Methode verlangt ein schnelles und sauberes Arbeiten. Zum Schneiden ist ein Schlittenmikrotom zu empfehlen, das Messer ist nach jedem Schnitt gut zu reinigen. „Man macht rasch nicht allzu dünne Schnitte durch Blätter oder Stengel unter starker Befeuchtung des Messers und des Objektes mit dem Reagens und läßt in diesem die Schnitte etwa 1—2 Minuten liegen, worauf man sie in destilliertem (!) Wasser auswäscht. Hierauf können sie in Glyzerin oder Kanadabalsam eingelegt werden."

In Pangium edule findet sich die Blausäure im Siebteil, in der Epidermis, in den Basalzellen der Trichome und in einzelnen Zellen des Markes und der Rinde. Ein einziger Baum soll nach Greshoff 350 g Blausäure enthalten. Bei den bisher untersuchten Pflanzen hat sich allenthalben die gleiche Lokalisation gezeigt. Die Blausäure ist lokalisiert im Stamm (Phloem, Pericykel, in „Spezialzellen" von Mark und Rinde), in Zweigen (auch in der Epidermis, im Periderm, in Rindenmarkstrahlen und im Kambium), in Blüten und Früchten (Phloem), im Samen (in den äußeren Endospermschichten, nicht im Embryo) und im Blatte (bis zu mehr als 1 % der Trockensubstanz, im Mesophyll, in vereinzelten Palisaden, Oxalatzellen, Basalzellen der Trichome, untere Epidermis, Bündelscheiden und Phloem).

Das bekannteste Blausäureglykosid ist das **Amygdalin**, das Leitglykosid der Pomaceen, Prunaceen u. a. Aus Wasser kristallisiert es in prismatischen Kristallen, aus Alkohol in glänzenden Blättchen. Unter Deckglas lösen sich kleine Mengen leicht in Wasser und in Alkohol; in Äther ist es unlöslich. Vorzüglich die Samen sind amygdalinreich. (Amygdalus amara 3—4, A. persica 2,35, Prunus domestica 0,95, P. sphaerocarpa 0,91, P. malus 0,60, P. cerasus 0,82, Eriobotrya japonica 0,15 %). Reichliche Mengen finden sich in der Rinde (Prunus padus[1], P. laurocerasus, P. virginiana) und ein schönes Versuchsobjekt bilden die Blätter von P. laurocerasus.

Über den Nachweis und die Lokalisation des Amygdalins in Mandeln hatte Guignard[2]) nachstehende Befunde mitgeteilt: Amygdalin findet sich im Parenchym, das, aus dem Glykosid die Blausäure abspaltende Emulsin nur im Pericykel und in der Endodermis, begleitet

[1]) Nach eigenen Befunden muß der Gehalt in Prunus padus sehr schwanken; verschiedene frische Rinden hatten bei makrochemischer Prüfung keine Spur Blausäure.

[2]) L. Guignard, Sur la localisation dans les amandes et le lauriercerise des principes, qui fournissent l'acide cyanhydrique, Bull. Soc. Belge de Micr., 1890, XVI, S. 66.

daher nur die Bündel. Eine mechanische Trennung beider Gewebselemente ist mit einiger Sorgfalt leicht durchführbar. Werden mehrere Schnitte durch das von Bündeln freie, äußere Parenchym in etwas Wasser auf dem Objektträger erwärmt, so entwickelt sich kein Geruch von Blausäure. Dieser tritt indessen sofort bei Zusatz von etwas Emulsinlösung oder von mehreren Bündelfragmenten (s. Emulsin) auf. Mit Mercuronitrat erhielt ich im gesamten Parenchym Ausscheidungen kleiner, kaum 1 μ großer, schwarzer Quecksilberkügelchen. Der Niederschlag war gleichmäßig verteilt. Die Aleuronkörner waren mehr oder weniger weitgehend zerstört, so daß sie die Beobachtung nicht störten.

Die Blausäureglykoside in Prunus laurocerasus (Blatt) sollten nach Guignard nur im Mesophyll, die glykosidspaltenden Enzyme nur in den Scheiden der Bündel auftreten. Zu völlig abweichenden Ergebnissen kam Peche, der für Pr. laurocerasus die gleiche Lokalisation wie für Pangium angibt. Daß die Reaktion mit Mercuronitrat ebenfalls zur Lokalisationsermittelung der Blausäure in den Zellen selbst dienen kann, wie Peche meint, der die Chlorophyllkörner für den Sitz und Bildungsort anspricht, bedarf weiterer Prüfungen, denn im Samen liegen die Quecksilberkügelchen auf und an den Globoiden und den teilweis zersetzten Aleuronkörnern.

Bryonin.

Das von Walz 1858 in der Wurzel von Bryonia alba aufgefundene Glykosid ist ein amorpher Körper, der bei der Spaltung Glykose und amorphe Produkte (Bryoretin u. a.) liefern soll. Bryonin löst sich leicht in Wasser und Alkohol.

Bryonin wurde von Braemer (Lit. S. 338, 1) nachgewiesen mit Schwefelsäure (blutrot), Froehdes Reagens (grünrot), Mandelins Reagens (blutrot, blauviolett) und mit Silbernitrat (1 : 100, roter Niederschlag). Es findet sich in schlauchförmigen Idioblasten in der Peripherie der Bündel.

Coniferin.

Das Glykosid Coniferin, gewonnen aus dem Kambialsaft der Nadelhölzer, stellt farblose Nadeln dar, die sich in 200 Teilen kaltem Wasser, leicht in heißem Wasser oder in Alkohol lösen und in Äther unlöslich sind. Phloroglucinsalzsäure färbt rot, Phenolsalzsäure blau, konz. Schwefelsäure schmutzig violett. Bei der Hydrolyse spaltet sich Coniferin in Glykose und Coniferylalkohol. Von vielen Autoren wird angenommen, daß die Reaktionen, die verholzte Membranen geben (s. d.), auf Coniferin hinweisen. Bei der Mikrochemie der Zellinhalte kommt Coniferin kaum in Betracht, obwohl es als Muttersubstanz in Frage kommt (Vanillin); die angeführten Farbenreaktionen dienen zur Orientierung.

Convallamarin und Convallarin.

Aus blühender Convallaria majalis sind von Walz zwei Glykoside gewonnen worden: aus dem wässerigen Auszug Convallamarin, das leicht löslich in Wasser und Alkohol, fast unlöslich in Äther und Chloroform ist; aus dem alkoholischen Auszug Convallarin, leicht löslich in Alkohol, unlöslich in Äther, kaum löslich in Wasser. Die Spaltungsprodukte sind noch nicht genügend erforscht.

Die Schwefelsäurereaktion wurde von Theorin[1]) zum mikrochemischen Nachweis verwendet. Die Glykosidzellen (Blatt, Stamm, Wurzel) zeigen Violettfärbung. In neuerer Zeit hat Reichard[2]) verschiedene Farbenreaktionen für die isolierten Glykoside mitgeteilt, mit denen ich aber in den Zellen keine Resultate erhalten konnte. Hingegen wurde eine tiefblaue Farbenreaktion erhalten beim direkten Einlegen der Schnitte in Froehdes Reagens. Die Reaktion entsteht sofort. Die Reaktionen mit Froehde und die mit Schwefelsäure treten in den gleichen Zellen ein. Sie sind am stärksten in den chlorophyllreichen Zellen und nehmen gleichzeitig mit dem Chlorophyllgehalt an Schärfe ab (Fig. 92). Die Reaktion mit Schwefelsäure wird nur durch Convallamarin bedingt, die mit Froehde kommt ausschließlich dem Convallarin zu. Beide Glykoside sind somit in Übereinstimmung mit Theorin in den Palisaden lokalisiert und in den Blattstielen in den chlorophyllführenden subepidermalen Zellen. Bei der Untersuchung ist auf pilzfreies Material zu achten, denn Mitlacher[3]) und Senft (Lit. S. 188, 1), haben gefunden, daß Pilze die Glykoside leicht zersetzen. Die Zerlegung gelang auch durch künstliche Infektion mit Schimmelpilzen. Der abgespaltene Zucker gelangt dann vorzüglich in der Epidermis zur Abscheidung (bei getrockneten Blättern in Kristallbüscheln).

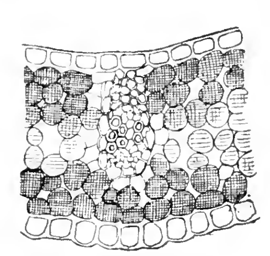


Fig. 92. Convallaria majalis (Blatt), die Schraffierung zeigt den Sitz der Glykoside an (Tunmann).

Coriamyrtin.

Coriamyrtin, ein glykosidischer Bitterstoff der Früchte und Blätter von Coriaria myrtifolia L., wurde von Riban (Compt. rend., LVII, LXIII) in monoklinen Prismen erhalten, die sich leicht in Äther, Chloroform, Benzol lösen und mit Brom und Jod kristallinische Verbindungen geben.

[1]) P. G. Theorin, Einige pflanzenmikrochemische Notizen, Sv. V. Öfvers., 1885, Nr. V, S. 29.

[2]) C. Reichard, Beiträge zur Kenntnis der Glykosidreaktionen, Convallamarin und Convallarin, Pharm. Zentralh., 1911, LII, S. 183.

[3]) W. Mitlacher, Die zur Neuaufnahme in die 8. Ausgabe der öster. Pharmakopoe in Aussicht genommenen Drogen, Pharm. Post, 1902, XXXV, Sep.

Der mikrochemische Nachweis des Coriamyrtins in den Blättern des Gerberstrauches wurde von Hanausek[1]) erbracht. Nach Vorbehandlung der Präparate mit Alkohol ruft Kalilauge im Blattmesophyll einen braunroten Niederschlag hervor. Durch nachfolgenden Zusatz von Schwefelsäure wird das Mesophyll wieder grün. Die Reaktion tritt auch ein, wenn der meiste Gerbstoff durch Auswaschen mit Wasser zuvor aus den Schnitten entfernt ist. Ammoniak bedingt einen braunen Niederschlag. Beweisend ist ferner die Reaktion mit Jodwasserstoff-Natronlauge. Man legt die Präparate in eine ältere Jodjodkaliumlösung (die bekanntlich stets Jodwasserstoffsäure enthält) und löst den entstehenden schwarzen Niederschlag in Alkohol. Setzt man alsdann einen Topfen konz. Natronlauge zu, so bildet sich sofort eine purpurviolette Fällung, aus der sich tiefrote Körnchen abscheiden. Innerhalb 15 Minuten entsteht schließlich ein bleibender gelber Niederschlag. In den Blättern tritt das Glykosid in allen Teilen des Mesophylls auf, „nur das Füllgewebe und die Gefäßbündel scheinen dasselbe nicht zu enthalten“.

Crocin.

Das Glykosid Crocin wird aus dem wässerigen Auszug der entfetteten Crocus-Droge gewonnen, bildet ein amorphes gelbes Pulver, das unlöslich in Äther, schwer löslich in absolutem Alkohol, leicht löslich in Wasser und Weingeist ist und bei der Spaltung mit verd. Schwefelsäure in Glukose (Crocose) und amorphes rotes Crocetin zerfällt. Es gibt eine Anzahl Farbenreaktionen. Die Reaktionen mit Schwefelsäure (anfangs indigoblau, dann violett, schließlich braun) und mit Salpetersäure (blau, schließlich gelb), die auch mit dem Aglykon, dem Crocetin, erhalten und jedenfalls nur durch dieses bedingt werden, deuten auf Beziehungen zum Carotin hin[2]).

Crocin kommt in den Narbenschenkeln von Crocus sativus L. vor und zwar, wie Molisch (Histochemie 1891, S. 57) bei Crocus vernus fand, wahrscheinlich im Zellsaft gelöst. Beim Absterben der Zellen durchdringt der Farbstoff Plasma und Zellwände. Zur Untersuchung läßt man die Droge, frisches Material ist nicht leicht zur Hand, einige Stunden an der Luft oder in einer feuchten Kammer liegen. Betrachtet man Präparate in Öl, dann sieht man gelbliche Membranen und Zelllumina, die von einer homogenen gelbrötlichen Substanz völlig erfüllt sind (die Chromatophoren sind selten gut zu erkennen und treten erst an Alkoholmaterial deutlicher hervor). Man kann auch in Anilin ein-

[1] T. F. Hanausek, Über Folia Coriariae, Pharm. Post., 1892, XXV, S. 1342.

[2]) Nach O. Schüler ist Crocin ein Phytosterinester der Palmitin- und Stearinsäure (Dissertation Erlangen, 1899).

legen. Der Farbstoff löst sich in beiden Flüssigkeiten nicht, in Anilin erst beim Kochen. Von Molisch wurden die Reaktionen mit Schwefelsäure und mit Salpetersäure empfohlen. Doch wendet man gegenwärtig weitere Reaktionen an, besonders bei der Prüfung des Safranpulvers auf seine gebräuchlichen Verfälschungen. Tschirch hat (Anatom. Atlas S. 93) eine praktische Tabelle hierzu ausgearbeitet, die nebenstehend in gekürzter Form wiedergegeben ist (S. 365). Die Reaktionen, auf dem Objektträger (auf weißer Unterlage) ausgeführt, lassen sich makroskopisch verfolgen. Das betreffende Pulver wird direkt in dem Reagenstropfen mit einem Glasstabe verrührt.

Der Safran gibt ein Mikrosublimat, in dem gelbe ölige Massen verteilt sind, aus denen fast farblose Nadeln anschießen.

Die Reaktion von Dekker[1]) würde wahrscheinlich mikrochemisch durchführbar sein. Dieser erhielt ein kristallinisches Ammoniumsalz des Crocetins in Form gelber Nadeln durch Behandlung von Crocetin mit sehr verd. Natronlauge und Zusatz von Ammoniumkarbonat im Überschuß bei schwachem Erwärmen.

Daphnin.

Das 1827 von Vauquelin aufgefundene, dem Aesculin isomere Glykosid Daphnin wird aus dem alkoholischen Extrakte der Rinde von Daphne mezereum dargestellt und bildet farblose Prismen, die in Äther unlöslich, in kaltem Wasser sehr wenig, in heißem Wasser und in kochendem Alkohol leicht löslich sind. Von Alkalien wird das Glykosid mit gelber, von Salpetersäure mit roter Farbe gelöst. Daphninlösung wird von Eisenchlorid bläulich gefärbt. Bei der Hydrolyse mit verd. Säuren oder mit Emulsin entstehen Glykose und Daphnetin (Dioxycumarin, hellgelbe Prismen). Daphnin ist bisher nur in Daphne-Arten angetroffen worden, so in D. mezereum, D. alpina, D. laureola. In D. caucasica (0,5 cm starke Frühjahrszweige) fand ich kein Daphnin.

Die Lokalisation des Daphnins in Daphne mezereum studierte zuerst Sauvan[2]), der Kalilauge (goldgelbe Färbung) und konz. Salpetersäure (orangegelb bis blutrot) gebrauchte. Kalilauge wurde später auch von Goris[3]) benutzt (5,0 Lauge, 50,0 Wasser). Die Einwirkung der Lauge muß sofort verfolgt werden (goldgelbe Färbung), da sich nach kurzer Zeit der ganze Schnitt gelb färbt. Salpetersäure-Ammoniak gibt keine besseren Resultate. In Daphne laureola wurde das Glykosid von Russel[4]) verfolgt. Zur Anwendung kamen außer

[1]) F. Dekker, Chem. Ztg., 1906, XXX, S. 18.

[2]) L. Sauvan, Rep. de pharm., 1896, S. 55.

[3]) A. Goris, Rech. microchim. sur quelq. glucosides et quelq. tannins végétaux, Paris, Thèse 1903.

[4]) W. Russell, Essai sur la localisation de la daphnine chez le Daphne Laureola, Rev. gén. bot., 1902, XIV, S. 420.

	Konz. Schwefelsäure	Verd. Schwefelsäure (1 + 2)	Konz. Salzsäure	Kalilauge	Ammoniak	Wasser
Crocus	tiefblau — violett — rotbraun — schmutzig braungrün	dauernd orangegelb, Säure gefärbt	orangegelb, Säure dauernd gefärbt	braun, Alkali gelb	orangegelb	tief orangegelbe Lösung
Carthamus tinctorius (Saflor)	rot — sofort orangebraun — brauner Niederschlag	sofort gelb, Säure gelb	gelb, Säure gelb	gelbbraun, Alkali gelb	gelb	gelbe Lösung
Calendula-Blüten	gelb — sofort braunschwarz, Säure braungrün — karminrot — rotbrauner Niederschlag u. Säure entfärbt	unverändert	langsam bräunlich, Säure hellgelb	unverändert, Alkali schwach gelblich	unverändert	unverändert
Curcuma-Wurzel	orangegelb — orangerot — rotbrauner Niederschlag, Säure farblos	Sekretzellen karminrot, Säure farblos	bräunlich, Säure farblos	dauernd tieforange, Alkali gefärbt	rotorange	unverändert, Wasser farblos
Rotes Sandelholz	braunorange — rotbraun — rotbrauner Niederschlag	unverändert, Säure farblos	Säure und Farbstoff unverändert	karminrot, Alkali farblos	karminrot, Alkali farblos	unverändert, Wasser farblos
Campecheholz	kirschrot — orange — brauner Niederschlag	dauernd kirschrot, Säure gefärbt	dauernd kirschrot	blau, Alkali gefärbt, langsam grau	violett — rot — schnell verblassend	blaßrötliche Lösung

den genannten Reagentien: Jodjodkalium (orangerote Färbung), Eisensulfat und Phosphormolybdänsäure. Am schärfsten finde ich die Salpetersäurereaktion; sie kann zur Pulverdiagnose von D. mezereum herangezogen werden. Der Inhalt sämtlicher Parenchymelemente wird sofort rot. Die Färbung verblaßt nach einigen Minuten. Die Bastfasern der Daphnearten enthalten kein Glykosid. Die goldgelbe Färbung mit Kalilauge ist an altem Material und Pulver nicht scharf hervortretend. Eisenchloridlösung läßt sich an getrocknetem Material nicht verwenden.

Daphnin ist lokalisiert in Epidermis, Trichomen, im Pericykel der Rinde, in der Endodermis und im peripheren Mark; in der Wurzel ist das Bastparenchym glykosidreich (Goris).

Datiscin.

Datiscin (Datisca cannabina, Wurzel, Blätter, Braconnot, 1816) bildet farblose, bitter schmeckende Blättchen, die in kaltem Wasser fast unlöslich sind, sich leicht in heißem Wasser und in Alkohol lösen und bei der Hydrolyse mit verd. Säuren in Rhamnose und Datiscetin zerlegt werden. Das Aglykon, ein Xanthonderivat, bildet gelbe Nadeln, die von konz. Schwefelsäure mit gelber Farbe gelöst werden; ihre Lösung fluoresziert blau.

Mit der Mikrochemie hat sich Herrmann (S. 9 der auf S. 220, 2 angef. Diss.) beschäftigt. Mit Kalk- oder Barytwasser wird Datiscin rein gelb, nachfolgender Zusatz von Essigsäure oder von verd. Salzsäure bedingt sofortige Entfärbung. Weniger vorteilhaft sind folgende Fällungsreagentien: Bleiazetat (gelb), Zinnchlorür (gelb), Kupferoxydsalze (grünlich), Eisenchlorid (braungrün). Herrmann hat Datiscin im Zellsaft des Rindenparenchyms angetroffen, gibt es aber auch als Membraneinlagerung dickwandiger Elemente an (Epidermiszellen, Libriform und Holz, mit Ausnahme der Gefäße); wahrscheinlich wurde getrocknetes Material untersucht, bei dem das Glykosid oder sein Aglykon zum Teil von der Membran gespeichert wurde. Trägt man die Präparate direkt in das Reagens ein, dann bemerkt man die Reaktion nur im Zellinhalte. — Die Sublimation ist noch zu versuchen.

Derrid.

Derrid (Greshoff, 1890), in der Wurzelrinde von Derris elliptica Bth., Lonchocarpus violaceus, Mundelea suberosa enthalten, ist unlöslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol, Äther, Chloroform und Petroläther und bildet ein hellgelbes, amorphes Pulver. Wahrscheinlich liegt es in der Zelle in glykosidischer Bindung vor. Derrid ist stickstofffrei.

In Derris elliptica ist es hauptsächlich in den Markstrahlen und in der Nähe des sklerotischen Ringes lokalisiert, viel weniger im Holz (Hartwich und Geiger[1]); mit konz. Schwefelsäure und einer Spur

[1] C. Hartwich u. P. Geiger, Beiträge z. Kenntn. d. Ipoh-Gifte u. einiger zu ihrer Herstellung verwendeter Pflanzen, Arch. d. Pharm., 1901, CCXXXIX, S. 491.

Eisenchlorid gibt es eine blutrote, mit konz. Schwefelsäure eine gelbrote Farbenreaktion.

Dulcamarin.

In Solanum dulcamara hatte Wittstein neben Solanin ein Alkaloid Dulcamarin angegeben. Geissler fand nur ein amorphes Glykosid vor, welches sich leicht in Essigsäure löst und unlöslich in Wasser, Äther und Chloroform ist. — Nach Masson (Bull. scienc. pharm., 1912, XIX, S. 283) ist Dulcamarin ein Körpergemisch (Dulcamarinsäure, Dulcamaretinsäure und Solacein). Solanin kommt nicht vor. Nach Russell sollen sich die reagierenden Substanzen zum Herbst in der Wurzel anhäufen (Lit. S. 285, 1).

Molle (Lit. S. 325, 2) hat zum Nachweis des (noch fragwürdigen) Dulcamarins benutzt: Jodjodkalium (hellbraune Tröpfchen), vor allem Schwefelsäure (braunrot, bald kirschrot). In den Auszügen war keine Base enthalten. Dulcamarin war im Stengel: im Vegetationspunkt, in der Epidermis, im Rindenparenchym und Mark; in älteren Stengeln: im Rindenparenchym und im peripheren Mark; im Blatt: in Epidermis und Nervenparenchym (Spuren im Mesophyll); in der Wurzel: Kork und Rinde (s. auch S. 330).

Elateringlykosid.

In dem Fruchtsafte von Ecballium elaterium tritt ein Glykosid auf (A. Berg), welches bei der Hydrolyse Zucker und Elaterin liefert; letzteres kristallisiert in Täfelchen und Prismen, die sich nicht in Wasser, schwer in Äther, leicht in Alkohol lösen und einige Farbenreaktionen geben.

Braemer (Lit. S. 338, 1) gibt das Glykosid in der Umgebung der Bündel an und wies es nach mit Schwefelsäure (blutrot), Froehdes Reagens (grün, rot), Mandelins Reagens (rot) sowie Phenol-Schwefelsäure (1 + 1, von D. Lindo, Ztschr. anal. Chem., 1878, S. 500 empfohlen) karminrot.

Fraxin.

Fraxin wird aus der Rinde von Fraxinus excelsior durch Auskochen mit Wasser gewonnen, bildet farblose Nadeln, die sich schwer in Wasser, wenig in kaltem Alkohol und in Äther, leicht in heißem Wasser und in heißem Akohol lösen und sich beim Kochen mit verd. Schwefelsäure in Glykose und Fraxetin (Methoxy-Aesculetin, kleine Täfelchen) spalten. Fraxin ist gefunden worden in Stamm- und Wurzelrinde von Fraxinus ornus (Dufour), F. excelsior (Salm-Horstmar), Aesculus hippocastanum, A. pavia (Stokes, Rochleder) und in neuerer Zeit in Diervilla lutea, D. japonica[1]) (Charaux, 1911). Nach Russell[2]) soll es sich zur

[1]) Mit der Rinde von D. floribunda erhielt ich ebenfalls einen blau fluoreszierenden wässerigen Auszug.

[2]) W. Russell, Sur le siège de quelques principes actifs des végétaux pendant le repos hivernal, Rev. gén. de Bot., 1903, XV, S. 160.

Winterszeit in den basalen Teilen des Stammes und in der Wurzel anhäufen (Diervilla lutea im Winter bis 3 % in der Wurzelrinde).

Über die Gegenwart von Fraxin unterrichtet man sich leicht durch Aufkochen eines Stückchen des Stengels oder der Wurzel mit schwach alkalischem Wasser. Die Abkochung muß blau fluoreszieren. Mit der Mikrochemie beschäftigte sich Goris (Lit. S. 341, 1). Er benutzte zum Nachweis 2 %ige Kalilauge oder Ammoniak (zur Hälfte mit Wasser verdünnt, Einwirkung 2 Sekunden), wodurch eine gelbe Farbenreaktion eintritt, sowie Sonnenscheins Reagens, das eine veilchenblaue Färbung hervorruft. Die eisenhaltige Salpetersäure (S. 342) wird mit Wasser verdünnt (2 Säure, 1 Wasser), die Präparate werden nur auf zwei Sekunden hineingebracht, dann in Ammoniak eingetaucht und in Glyzerin untersucht. Auch Kalkwasser, das etwa 1/2 Minute auf die Präparate einwirkte. wurde mit Erfolg benutzt.

Fustin.

Fustin (Chevreul) bildet glänzende Nadeln, die sich leicht in heißem Wasser, verdünnten Ätzalkalien und Alkohol lösen und bei der Hydrolyse in Rhamnose (?) und Fisetin (Trioxyflavonol) zerlegt werden. Letzteres stellt gelbliche Nadeln dar, die in Alkohol, Azeton, Essigsäure leicht löslich sind. Fustin kommt als Fustintannid im Kernholze von Rhus cotinus, R. rhodanthema und Schinopsis-Arten vor und soll auch in den Blüten von Butea frondosa enthalten sein (?).

Zum Fustinnachweis, der durch den gleichzeitig anwesenden freien Gerbstoff erschwert wird, zog Goris Salpetersäure-Ammoniak heran (Lit. S. 341, 1), es erfolgt Rotfärbung. Die gleiche Farbenreaktion erhielt ich mit Salpetersäure allein bei einem 0,5 cm starken Zweige und zwar trat die Reaktion im gesamten Parenchym der Rinde ein, im Holze nur in den Markstrahlen. Vorteilhaft werden die freien Gerbstoffe zum Teil durch Wässern aus den Schnitten möglichst entfernt. Mit Zinnchlorür, Bleiazetat und Kupferazetat tritt eine gelbe Fällung ein, die sich in Essigsäure leicht löst, aber schwer sichtbar ist. Brauchbar ist, besonders an gewässerten Schnitten, die Reaktion mit Eisenchlorid-Natriumcarbonat. Die Schnitte kommen auf 2 Minuten in Eisenchlorid, werden abgespült und in Sodalösung übertragen (rotblaue Färbung). Die Membranen jüngerer Zweige des Holzes geben keine Reaktion.

Helleborin, Helleborein.

Wurzeln und Schuppenblätter von Helleborus viridis, foetidus und niger führen zwei Glykoside, Helleborein (aus Nadeln bestehende Sphärokristalle, mit konz. Schwefelsäure braunrot, langsam violett werdend, wasserlöslich) und Helleborin (in alten Wurzeln 0,025—0,045 %, in Wasser unlösliche Nadeln, mit konz. Schwefelsäure hochrot).

Mikrochemisch wurde nur Helleborus niger untersucht (Vanderlinden, Lit. S. 286, 1). Mit konz. Schwefelsäure entsteht eine rote Farbenreaktion im äußeren Wurzelparenchym, schwach in der Wurzelhaube, nicht in den Vegetationsspitzen und in den vegetativen Teilen. Außerdem wurde Naphthol (Thymol)-Schwefelsäure benutzt (s. S. 192), die nach Spaltung der Glykoside (nach 10—15 Minuten) rot färbt. Ausreichend sind die Befunde nicht, eine weitere Bearbeitung ist erforderlich. Nach O. Kellers makrochemischer Untersuchung (Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 465) wird Helleborin mit konz. Schwefelsäure „feurig karminrot, auf Zusatz von Wasser erfolgt weiße flockige Fällung", mit Formalinschwefelsäure rot, gelbbraun, erwärmt rotbraun, mit Froehdes Reagens braun, heiß hellgelb. Da aber beide Glykoside in den gleichen Zellen auftreten werden, so wird man nur Mischfarben erhalten. Zu versuchen wäre eine Entfernung des Helleboreins durch Wässern der Schnitte.

Hesperidin.

Hesperidin, 1828 von Lebreton in Citrusfrüchten aufgefunden, wurde vorzüglich von Pfeffer (1874), Tiemann u. Will (1881) u. a. näher erforscht. Es bildet feine farblose Nadeln, die bei der Hydrolyse Glykose, Rhamnose und Hesperetin (Phlorglucinester der Isoferulasäure) liefern. Im Pflanzenreiche tritt Hesperidin in den verschiedensten Familien auf, in Lobeliaceen, Valerianaceen, Lythrarieen, Umbelliferen, Labiaten, Compositen, Papilionaceen, Rutaceen. Seine Verbreitung und Lokalisation bei den Citrus-Arten wurde eingehend schon von Pfeffer[1]) studiert. In Monokotylen ist es äußerst selten. Es kommt im Zellsaft gelöst vor und zwar vorwiegend in der Epidermis, bei bifacialen Blättern vorzugsweise in der oberen Epidermis, dann in Stengeln, Rhizomen, Blüten, Früchten. Im Samen ist Hesperidin noch nicht gefunden worden. Mitlacher[2]) fand es bei einigen Labiaten in den Palisaden; auch in Trichomen ist es beobachtet worden, sowie in den Keimpflänzchen (Tunmann)[3]).

Hesperidin bildet sich im Jugendstadium der Organe und zwar unabhängig vom Lichte (Hyssopus), die spätere Zunahme ist gering. Einmal gebildet, läßt es sich weder durch andauernde Verdunkelung noch in Kulturen durch Kalzium- oder Eisenmangel in den Stoffwechselprozeß wieder einbeziehen. Beim Welken und beim Laubfall läßt sich eine Rückwanderung ebenfalls nicht ermitteln. Große Hesperidinmengen finden sich im abgefallenen Laube. Die verschiedentlich angegebene Abnahme in den Citrusfrüchten während des Reifens ist wahrscheinlich

[1]) W. Pfeffer, Hesperidin, ein Bestandteil einiger Hesperideen, Bot. Ztg., 1874, XXXII, S. 529.

[2]) W. Mitlacher, Über einige anatomische Verhältnisse der Labiaten, Ztschr. öst. Apoth. Ver., 1908, LII, Nr. 1.

[3]) O. Tunmann, Hyssopus officinalis, Ztschr. d. allg. öst. Apoth. Ver., 1906, L, Nr. 30.

keine absolute. Da es häufig bei Sonnenpflanzen auftritt, in den Blättern überwiegend in der belichteten Epidermis vorkommt und durch reichliches Vorkommen den Zellsaft zähflüssig-dick und gelblich macht, so ist die Annahme berechtigt, daß Hesperidin bisweilen als Schutz gegen zu intensive Belichtung dient (Lichtfilter, Dämpfungsschirm). Zellen, die blauroten Farbstoff führen (Mentha, Conium maculatum) sind frei von Hesperidinen[1].

Borodin[2]) hat etwa 3000 Pflanzen auf Hesperidin untersucht und die Ausscheidungen je nach ihrer Löslichkeit in Ammoniak, dem Verhalten gegen polarisiertes Licht und nach dem Orte des Auftretens in zwei Gruppen geteilt: Hesperidin stark doppelbrechend, schwer und mit gelber Farbe löslich in Ammoniak, Pseudohesperidin leicht und farblos löslich in Ammoniak, oft in den Schließzellen der Spaltöffnungen auftretend. Diese Einteilung kann nicht aufrecht erhalten werden, da zwischen Hesperidin und Pseudohesperidin Übergänge auftreten, was übrigens schon Borodin beobachtete. Die Borodinschen Untersuchungen sind weiten Kreisen unbekannt geblieben, daher nicht nachgeprüft worden. Unabhängig von ihnen sind die nachstehend angeführten Ausscheidungen für Hesperidin angesprochen und wenigstens mikroskopisch etwas eingehender studiert worden.

1872 vergleicht Sachs[3]) die Citrusausscheidungen mit Inulin; im gleichen Jahre fand Kraus[4]) in Coceulus laurifolius Sphärokristalle von Hesperidin; die Identität mit dem Citrushesperidin wurde von Pfeffer (a. a. O.) bestätigt. Die Kristalle in Conium maculatum hielt Ad. Meyer[5]) für Hesperidin, was von Tschirch[6]) verneint, von Modrakowsky (a. a. O.) makrochemisch sicher gestellt wurde. Vielfache Bearbeitung haben erfahren die Kristalle der Bukkublätter (Flückiger, Shimoyama[7]), Braemer[8]), Kramer[9]), Vogl[10]) u. a.) und

[1]) O. Tunmann, Üb. d. Kristalle in Herba Conii, Pharm. Ztg., 1905, L, S. 1055.

[2]) Borodin, Sitzber. d. bot. Sekt. d. Ges. d. Naturf., Petersburg, 1883, nur Russisch; das eingehendste Referat hierüber bei: G. Modrakowsky, Über das Hesperidin in Conium maculatum, Poln. Arch. f. biol. u. med. Wiss., 1905, III, B. Sep. Hier auch der Befund, daß der Schmelzpunkt des Hesperidins bei 270° liegt und nicht, wie Tiemann und Will angeben, bei 251°.

[3]) J. Sachs, Lehrb. d. Botanik, 1872, 3. Aufl., S. 66.

[4]) G. Kraus, Über eigentümliche Sphärokristalle in der Epidermis von Cocculus laurifolius, Jahrb. wiss. Bot., 1872, VIII, S. 421.

[5]) Ad. Meyer, Anatomische Charakteristik offizineller Blätter und Kräuter, Abh. Naturf. Ges., Halle 1882, XV, S. 452, Sep.

[6]) A. Tschirch-Oesterle, Anatom. Atlas, 1895, S. 156.

[7]) J. Shimoyama, Beitr. z. Kennt. der Bukkublätter, Arch. d. Pharm., 1888, CCXXVI, S 67.

[8]) L. Braemer, Les réactions histochimiques de l'hespéridine, Ass. franc. p. l'avenc. d. sciences, Besançon 1893, Sep.

[9]) H. Kramer, Mikr.-pharm. Beitr. z. Kenntn. von Blättern und Blüten, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1907, XVII, S. 314.

[10]) A. Vogl, Über Folia Jaborandi, Ztschr. d. öst. Apoth. Ver., 1896, XL, Sep.

der Pilocarpus-Arten (Vogl, Geiger[1]). Bei den Aleppogallen betont Hartwich[2]) die abweichenden Lösungsverhältnisse, ebenso Tschirch bei Mentha, in der die Kristalle übrigens nicht in derart großer Menge auftreten, wie in Hyssopus und Tilia. Capsella bursa pastoris wurde vor Borodin schon von Mika[3]) untersucht. Die Kristalle in Scrophularia nodosa (Mika, Vogl), ferner im Lamium orvala, Galeobdolon, Ballota, Calamintha finden sich nach Mitlacher auch in den Palisaden.

Hesperidin ist stets im Zellsaft gelöst und scheidet sich bei Wasserentzug aus. Die Ausscheidung läßt sich an Flächenschnitten (Hyssopus, Capsella, Brakteen von Tilia) an lebendem Material verfolgen. Auf Zusatz von Glyzerin scheiden sich im Zellsaft kleinere und größere stark lichtbrechende Tröpfchen aus, die schnell zu einem großen Tropfen zusammenfließen, der von dem stark plasmolysierten Plasmaschlauch umgeben wird. In 10 Minuten nimmt der Tropfen sphärokristallinische Natur an, während das Zentrum substanzärmer wird und schließlich als kleiner Hohlraum hervortritt. Sphärokristalle aus Herbar- oder Alkoholmaterial sind oft mit einer optisch wenig erkennbaren homogenen Masse umgeben, die bei Einwirkung von Kalkwasser ungelöst zurückbleibt und wahrscheinlich aus einem Polysaccharid besteht, welches jedoch Fehlingsche Lösung nicht reduziert (Fig. 93c). Diese Hüllmasse bedingt zum großen Teile, daß die mikrochemischen Reaktionen nicht mit denen des chemisch reinen Hesperidins übereinstimmen. Erhitzt oder kocht man Präparate lebenden Materials in Wasser, Glyzerin, Chloralhydratlösung oder in verd. Säuren, dann entstehen fast ausschließlich locker angeordnete Kristallbüschel, deren farblose Einzelkristalle als lange Nadeln oder Spieße das ganze Zelllumen erfüllen, gewissermaßen die Zellwände durchsetzen.

Untersucht man Pflanzen, die lebend in Alkohol, Glyzerin oder in Wasser eingelegt wurden, dann finden sich die Kristalle nicht nur in der Epidermis, sondern auch im Mesophyll und im Leitparenchym, und zwar sind ganze Strecken kristallfrei, während man anderseits auf Kristallmassen trifft, die eine Gruppe von Zellen völlig erfüllen (Fig. 93b). Diese Ausscheidung rührt daher, daß die Einlegeflüssigkeit die kristallisierbare Substanz auf weite Strecken mitreißt, bis die Lösung so konzentriert wird, daß es in einer Zellgruppe zur Kristallisation kommt. Um sich von der Verteilung des Glykosides eine richtige Vorstellung machen zu können, muß man Schnitte frischen Materials auf dem

---

[1]) H. Geiger, Beitr. z. pharm. u. bot. Kenntn. der Jaborandiblätter, Dissertation, Zürich, 1896, S. 41.

[2]) C. Hartwich, Übersicht der technisch u. pharm. verwendeten Gallen, Arch. d. Pharm., 1883, CCXXI, S. 822.

[3]) K. Mika, (Ung.) Just bot. Jahrb., 1878, I, S. 20.

Objektträger in wenig Alkohol legen, den man langsam verdunsten läßt; es scheiden sich alsdann in jeder Zelle der Epidermis Kristalle aus, einige Zellen führen Kristallsand, andere größere Kristallbüschel. Die Substanz wird gleichsam in verschiedenen Stadien der Kristallisation fixiert (Fig. 93a). Werden die Präparate in viel Wasser oder Alkohol gelegt, dann entstehen überwiegend Sphärokristalle. Auf diese Weise fand ich im Blattmesophyll kein Hesperidin (s. ob.).

Vielfach wird über Abweichungen in den Löslichkeitsverhältnissen der Kristalle berichtet. Wie bereits erwähnt, sind diese Angaben zum Teil auf Schleimhüllen zurückzuführen, die das Eindringen der Reagentien verhindern. Mehrfach bestehen indessen kleinere Abweichungen, die es wahrscheinlich machen, daß nicht in allen Fällen die gleiche Substanz, sondern sehr nahe stehende Körper vorliegen. Abweichungen

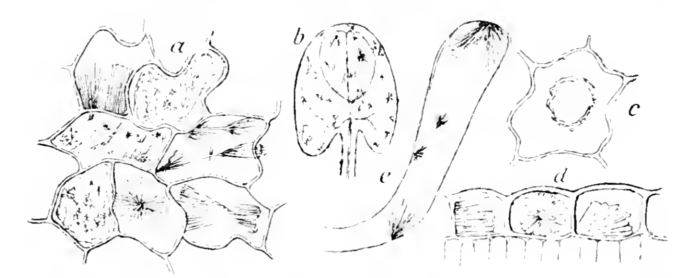


Fig. 93. Hesperidinkristalle. Hyssopus officinalis, *a*) Blattepidermis, lebend unter Deckglas in Alkohol gelegt, nach dem Verdunsten des Alkohols; *b*) Keimblatt, Alkoholmaterial mit Chloralhydrat aufgehellt, Anhäufung in Zellgruppen; *c*) nach dem Lösen der Kristallsubstanz mit Barytwasser bleibt eine Hüllmasse zurück; *d*) Kristalle der Epidermis, Herbarmaterial; *e*) Verbascum, junges Antherenhaar der Knospe, die Verdickungsleisten noch nicht gebildet, in Wasser aufgekocht (Tunmann).

wären bereits durch die verschiedene Zusammensetzung des Zuckers gegeben. Auch die Chemie berichtet über, dem Hesperidin nahestehende, Körper (Naringin). Daher wurde vorgeschlagen (Tunmann)[1]), alle die Körper, welche die hauptsächlichsten Hesperidinreaktionen geben und für die eine chemische Analyse noch nicht vorliegt, zu einer Hesperidingruppe zusammenzufassen.

Die mikrochemische Charakteristik wäre folgende: Hesperidine sind Glykoside, die in den lebenden Zellen als mehr oder weniger zähflüssige Lösungen vorkommen und sich in den Präparaten frischen Materials

[1]) O Tunmann, Über kristallinische Ausscheidungen in einigen Drogen (Hesperidine) und über die phys. Bedeutung dieser Körper in d. Pflanzen. Verh. Naturf. Ges. Salzburg, 1910, II 1, S. 113, Schw. Wochschr. f. Ch. u. Ph., 1909, XLVII, Nr. 51 u. 52.

bei langsamem Zutritt von Wasser, Alkohol, Glyzerin oder Chloralhydratlösung in Gestalt von gelblichen Sphärokristallen ausscheiden. Die gleiche Kristallform erhält man beim Einlegen größerer Gewebestücke in diese Flüssigkeiten; alsdann finden sich die Kristalle aber nicht mehr am Entstehungsorte. Beim Erhitzen der Präparate in den genannten Reagentien erhält man überwiegend Garben und Büschel farbloser langer Nadeln. Im polarisierten Lichte verhalten sich die Kristalle je nach ihrer Abscheidung verschieden. Bei schnellem Trocknen der Pflanzen (Pressen) scheiden sich die Hesperidine als inulinähnliche Klumpen und Schollen aus, beim langsamen Trocknen an der Luft zersetzen sich einige; diese sind dann in den Drogen nicht immer und nicht so zahlreich zu finden (Tilia); dafür findet sich der abgespaltene Zucker. Hesperidinkristalle sind unlöslich in Wasser, Alkohol[1]), Glyzerin, Äther, Chloroform, Chloralhydrat, verd. Schwefelsäure, verd. und konz. Salz- und Salpetersäure; sie lösen sich sehr schwer und nur bei mehrtägiger Einwirkung in heißem Anilin, Ammoniak und heißer Essigsäure, sind verschieden leicht löslich in Kalk- und Barytwasser, hingegen leicht und mit gelber Farbe in verd. Kali- und Natronlauge. Konz. Schwefelsäure löst mit tiefgelber Farbe. Die Kristalle sind in den Zellen noch erhalten, wenn man größere Gewebestücke längere Zeit im Wasser aufkocht.

Besonderes Gewicht ist darauf zu legen, daß die gelbe Schwefelsäurelösung beim Erhitzen rotbraun wird und daß der Rückstand der Kalilösung bei Zusatz von konz. Schwefelsäure violett wird. Um störende Substanzen auszuschließen (Alkaloide), kann man die Präparate erst mit Weinsäure-Alkohol, Alkohol, heißem Wasser nacheinander behandeln; man bringt dann eine größere Anzahl der Schnitte auf dem Objektträger in einen Tropfen Kalilauge, hebt nach einiger Zeit die Schnitte heraus, läßt die Lösung eintrocknen und fügt Schwefelsäure zu; oder man bringt auf die vorbehandelten Präparate einen Tropfen Schwefelsäure, läßt nach 1—2 Minuten den Tropfen etwas seitwärts von den Schnitten fließen und erhitzt ihn sodann.

Die vielfach untersuchten Kristalle in den Staubfädenhaaren von Verbascum (Fig. 93 e) wurden für Glykose gehalten (Senft, Tichomirow). Sie sind aber selbst in heißem Wasser unlöslich und Tunmann sprach sie für Hesperidin an, eine Ansicht, die Rosenthaler (Chem. Ztg. 1910) bestätigte. Doch sind weitere Prüfungen angebracht, denn die Schwefelsäurelösung wird beim Erhitzen nicht rotbraun, auch die Kalilauge-Schwefelsäure-Reaktion tritt nicht in erforderlicher Schärfe ein, worauf ich früher bereits hinwies (Schw. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1909). Eine erneute Prüfung wird die Befunde von Bourquelot und Bridel (Compt.

[1]) Die sich in Wasser und in Alkohol lösenden Spuren kommen hier nicht in Betracht.

rend., 1910. CLI, S. 760) zu berücksichtigen haben. Diese Autoren haben einen zusammengesetzten Zucker (Verbascose) in Verbascum (Wurzeln) aufgefunden, der sich durch hohen Schmelzpunkt auszeichnet, Fehling nicht reduziert, in Nadeln kristallisiert, und sich nicht in kaltem Alkohol, wohl aber in heißem löst.

Indoxylglykosid.

Indigo, der blaue Farbstoff, kommt in den Pflanzen in Form eines farblosen Glykosides, des Indikans, vor. Indikan kann aus dem wässerigen Blätterextrakt von Indigofera-Arten durch Ausschüttlung mit Chloroform und Äther isoliert werden und kristallisiert in farblosen Prismen. Bei der Hydrolyse mit verdünnten Säuren oder Enzymen spaltet sich Indikan in Indoxyl und Traubenzucker. Indoxyl geht durch Sauerstoff in Indigotin (Indigo) über. Indikan kommt in vielen Pflanzen vor; es seien nur genannt: Indigofera-Arten, Polygonum tinctorium, Nerium tinctorium, Eupatorium indigoferum, Lonchocarpus cyanescens; es findet sich besonders in einigen Orchideen, Apocynaceen (Echitis religiosa, Wrightia antidysenterica), Asclepiadeen, Acanthaceen, Bignoniaceen, Polygonaceen, Papilionaceen u. a. Sitz des Glykosides sind die Laubblätter, vornehmlich die jungen Blätter; in den Wurzeln findet sich nur wenig Glykosid, in Frucht und Samen fehlt es gänzlich. Im Blatte tritt es in erster Linie in chlorophyllhaltigen Zellen auf. In Cruciferen (Isatis tinctoria) ist der Indigo als Indoxyl enthalten.

Zum mikrochemischen Nachweis des Indikans werden frisch gepflückte junge Blätter sofort nach dem Abpflücken in ein etwa 15 cm hohes und 5 cm breites Glasgefäß mit eingeschliffenem Glasstöpsel (sog. Präparatenglas) gebracht, auf dessen Boden ein kleines offenes Gefäß mit Ammoniak oder absolutem Alkohol aufgestellt ist[1]). Die Blätter bleiben etwa einen Tag lang in der Alkohol- resp. Ammoniakatmosphäre und werden alsdann auf einen Tag zur Entfernung des Chlorophylls in absoluten Alkohol eingelegt. Ob man Alkohol- oder Ammoniakdämpfe benutzt, muß für jeden einzelnen Fall erst ausprobiert werden. Bei Phajus grandifolius und Calanthe vestita liefert Alkohol, bei Isatis tinctoria Ammoniak die besten Resultate. Bei Benutzung von Chloroformdampf soll sich das entstehende Indigoblau nicht mehr an primärer Lagerstätte vorfinden. Die, aus den vom Chlorophyll befreiten, jetzt blau erscheinenden Blättern hergestellten Präparate werden in konz. wässeriger Chloralhydratlösung (5 : 2) untersucht. Farblos erscheinen die Gefäßbündel, nahezu farblos die Epidermis, während das Mesophyll und die Schließzellen blau sind. Bei näherer Betrachtung erkennt man winzige Körnchen von Indigoblau, die den Chlorophyllkörnern auf- und eingelagert sind. Nur wenig Indigokörnchen finden

[1]) H. Molisch, Vorkommen und Nachweis des Indikans in der Pflanze, Sitzb. Wien. Akad., 8. VI. 1893 und in: J. Wiesner, Rohstoffe des Pflanzenreiches, 1900, I, S. 422.

sich im übrigen Zellinhalt des Mesophylls, noch weniger in der Epidermis und in Trichomen. Da das Indigoblau sich ganz überwiegend im Chlorophyllkorn zeigt, so schließt Molisch[1]), daß das Indikan seinen Hauptsitz im Chlorophyllkorn hat. Beijerinck[2]) ist aber der Ansicht, daß Indikan im Cytoplasma auftritt und daß nur die spaltenden Enzyme in den Chlorophyllkörnern vorkommen. In den abgetöteten Zellen würde Indikan in die Chlorophyllkörner eindringen können und dort von den Enzymen gespalten werden.

Der Indigogehalt der einzelnen Zellen läßt sich auch in folgender etwas zeitraubender Weise ermitteln (Leake)[3]): Kleinere Gewebestücke werden in einer Fixierungsflüssigkeit (bestehend aus 2 ccm Eisessig, 1 ccm konz. Schwefelsäure, 100 ccm Wasser und 0,5 g Ammoniumpersulfat) mehrere Stunden hindurch mazeriert. Die Stücke dürfen nur so groß sein, daß sie von der Flüssigkeit in 6 bis höchstens 12 Stunden völlig durchdrungen sind. Sie werden 3 bis 4 Tage lang in täglich zu erneuerndem 50%igen Alkohol gewaschen. Die Dicke der Präparate richtet sich bei den einzelnen Pflanzen nach der Zellengröße. Leake empfiehlt Mikrotomschnitte bei Indigofera von 4 bis 5 μ Stärke, bei Polygonum tinctorium von 8 μ, bei Isatis, Phajus u. a. von 10 bis 12 μ. Nun werden die vom Paraffin befreiten Präparate nach kurzem Abspülen mit Alkohol in verd. Delafieldschen Hämatoxylin (Zusammensetzung s. Zellkern, 50 ccm Lösung + 300 ccm Wasser) wenigstens 12 Stunden gefärbt und schließlich mit Säurealkohol (1% Salzsäure in 50% Alkohol) abgewaschen, bis sie nahezu farblos erscheinen. Dann kommen die Schnitte auf eine Stunde in eine 1% Eosinlösung (Grübler), werden mit Alkohol entwässert, in Xylol übertragen und in Kanadabalsam eingebettet.

Unter der Bezeichnung „Pseudoindikan" faßt Molisch[4]) alle Chromogene zusammen, die unter ähnlichen Verhältnissen Farbstoffe liefern, in ihrer Natur aber vom Indigo abweichen. Hierher zählt der Farbstoff in Lathraea squamaria und der, welcher sich beim Absterben der Pflanzen in den Cystolithenzellen verschiedener Acanthaceen bildet. Bei Sanchezia und Goldfussia anisophylla führen nur die Cystolithenzellen der Blätter Pseudoindikan, bei Strobilanthes Deyerianus die Cystolithen-

[1]) H. Molisch, Über das Vorkommen von Indikan im Chlorophyllkorn der Indikanpflanzen, Ber. deusch. bot. Ges., 1899, XVII, S. 228.

[2]) M. Beijerinck, Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam, 1900, S. 495.

[3]) H. M. Leake, The localization of the indigo-producing substance in indigo-yielding plants, Annal. of. Bot., 1905, XIX, S. 297.

[4]) H. Molisch, Über Pseudoindikan, ein neues Chromogen in den Cystolithenzellen von Acanthaceen, Sitzb. Wien. Akad., 1899, CVIII,1, S. 479.

zellen aller Organe. Der blaue Farbstoff entsteht erst bei Verletzungen und bildet sich an der Oberfläche der Cystolithen, selten im Plasma.

Anschließend sei an dieser Stelle das chromogene Glykosid erwähnt, welches sich im Stengel und Blatt der brasilianischen Rubiacee Schenckia blumenaviana K. Sch. findet[1]. Blatt und Stengel sind dunkelgrün und nehmen beim Absterben eine rote Farbe an. Auch bei Verwundungen tritt in 1—2 Tagen an der Wundstelle Rotfärbung ein. Die Erzeugung der karminroten Farbe läßt sich an frisch gepflücktem Material mit Chloroformdampf bewirken (wie beim Indikan). Ähnlich wirkt Alkohol, ohne Wirkung ist Ammoniak. Das Chromogen von Schenckia, das auch in der Wurzel vorhanden ist, stimmt mit keinem der bekannten Pflanzenfarbstoffe überein. Durch siedendes Wasser oder heißen Alkohol wird das spaltende Ferment abgetötet, so daß sich die rote Farbe nicht mehr erzeugen läßt.

Den blauen Farbstoff im Arillus von Ravenala madagascariensis hält Schrötter[2] für Berlinerblau. In Benzol, Chloroform, Karbolxylol, Äther ist der Farbstoff unlöslich. In Bittermandel-, Rizinus-, Terpentin-, Olivenöl sind geringe Mengen löslich. Ammoniak, konz. Schwefelsäure, konz. Salzsäure, Eisessig, Salpetersäure rufen gelbgrüne bis smaragdgrüne Farben hervor. Teile des Arillus entfärben sich bei längerem Liegen in Wasser, nehmen aber beim Trocknen ihre ursprüngliche blaue Farbe wieder an. Da das Gewebe stark eisenhaltig ist und Berlinerblau gegen Reagentien ein gleiches Verhalten zeigt wie der Farbstoff, so wird dieser als Berlinerblau und nicht als Indigoblau angesprochen.

Menyanthin.

Menyanthin aus Menyanthes trifoliata stellt eine gelbliche amorphe Masse dar (Ludwig und Kromayer, 1861), die sich schwer in kaltem Wasser, leicht in heißem Wasser und in Alkohol löst. Die wässerige Lösung gibt mit einigen Alkaloidgruppenreagentien Niederschläge[3]. Bei der Hydrolyse mit verd. Schwefelsäure spaltet sich das Glykosid in Zucker und Menyanthol, eine nach Bittermandelöl riechende Flüssigkeit, die an der Luft in eine kristallinische Säure übergeht.

An einer etwa 8 Jahre alten Droge (Folia Trifolii fibrini) waren Reaktionen mit keinem der üblichen Reagentien zu erhalten: an ein-

[1] H. Molisch, Über ein neues, einen karminroten Farbstoff erzeugendes Chromogen in Schenckia blumenaviana K. Sch., Ber. d. bot. Ges., 1901, XIX, S. 149.

[2] H. Schrötter, Über den Farbstoff des Arillus von Afzelia Cuanzensis Welwitsch und Ravenala Madagascariensis Sonnerat nebst Bemerkungen über den anatomischen Bau der Samen, Sitzber. Wien. Ak., 1893, CII, 1. Abt, S. 381.

[3] K. Lendrich, Beitr. z. Kenntnis d. Bestandt. von Menyanthes trifoliata, Arch. d. Pharm., 1892, CCXXX, S. 38.

jähriger Droge traten die Reaktionen auch nur sehr schwach ein. Ein vorheriges Erweichen der Droge in Wasser muß vermieden werden. Nur bei Anwendung mehrerer Schnitte auf einmal traten im Untersuchungstropfen schwache Fällungen ein mit Jodreagentien (gelb), mit Kaliumquecksilberjodid (grau). Tannin war ohne Wirkung. Froehdes Reagens färbte die Chlorophyllzellen rotbraun. Eine eingehende Untersuchung, die erforderlich ist und die auch die Ausläufer berücksichtigen muß, hat von lebendem Material auszugehen. Im Rhizom (Radix Trifolii fibr.) erhält man mit Jodjodkalium, Kaliumquecksilberjodid und beim Kochen mit verd. Salzsäure nur geringe Fällungen. Kalilauge färbt chromgelb und liefert beim Erwärmen Kristalle, die noch näher zu prüfen sind. Typisch wirkt Schwefelsäure. Nach 5—10 Minuten entsteht im gesamten Parenchym eine starke, dunkelviolette Färbung (deutet auf Menyanthol), die mit Raspailscher Reaktion nicht verwechselt werden kann, einige Stunden bestehen bleibt und dann abblaßt. Saugt man ab, so fließen violette Streifen ab, sowie ein Niederschlag, der teils kleinkörnig ist, teils aus kleinen Kristallen besteht. Letztere sind 3—8 μ lang, teils stumpf endende, teils zugespitzte Nädelchen, die trotz ihrer geringen Größe lebhaft polarisieren.

Myriophyllin.

Myriophyllin nannte Raciborski[1]) eine in Vakuolen auftretende Substanz in den Haaren von Myriophyllum, die in Alkohol, Glyzerin, Kalilauge, Chloralhydrat, Ammoniak, Eisessig löslich ist, sich aber in konz. Mineralsäuren nicht löst, sondern nur eine gelbe, sowie in Vanillinsalzsäure eine kirschrote Färbung annimmt. Nach Pröscher[2]) rufen im Verein mit konz. Salzsäure auch andere Substanzen (Alkohole und Aldehyde) die Reaktion hervor, so Salizyl-, Zimt-, Anisaldehyd, Cuminol, Kresol, Methyl-, Äthyl-, Amylalkohol. Die Reaktion beruht auf einem Oxydationsvorgang und tritt bei den Haarbildungen der meisten Wasserpflanzen ein. Versuchsobjekte: Ceratophyllum demersum, Nuphar luteum, Rumex aquatilis. Wahrscheinlich ist Myriophyllin ein glykosidischer dem Phloroglucin nahestehender Körper: doch wird Phloroglucin mit Eisenchlorid blauschwarz, Myriophyllin aber rotbraun. Theorin[3]) ist der Ansicht, daß im Myriophyllin, welches

[1]) M. Raciborski, Über die Inhaltskörper der Myriophyllumtrichome, Ber. d. bot. Ges., 1893, XI, S. 348.

[2]) Fr. Pröscher, Untersuchungen über Raciborskis Myriophyllin, Ber. d. bot. Ges., 1895, XIII, S. 345.

[3]) P. G. E. Theorin, Mikrokemiska notiser om trichomer, Arkiv Bot., 1911, X, Sep.

er als Exkret auffaßt, ein Gemisch von Schleim, Gerbstoff und einer Phloroglucinverbindung vorliegt. Die Natur des Gerbstoffes wechselt bei den verschiedenen Pflanzen (Nuphar, Menyanthes, Hottonia). Mit einer frisch bereiteten, wässerigen konz. Chinonlösung wird Myriophyllin rötlich, während der in anderen Zellen des Gewebes auftretende Gerbstoff körnig braunschwarz wird. Raciborski[1]) benutzte in neuerer Zeit Dimethylamidobenzaldehyd zum Nachweis.

Phlorhizin.

Das von de Koninck und Stas 1835 aufgefundene Glykosid Phlorhizin (die unrichtige Schreibweise Phloridzin hat sich erst in neuerer Zeit eingebürgert) wird aus der frischen Wurzelrinde von Pirus malus in seidenglänzenden Nadeln erhalten (3—5 %), die sich leicht in Alkohol und heißem Wasser, schwer in Äther und erst in 1000 Teilen kalten Wassers lösen; beim Kochen mit verd. Säuren spaltet sich das Glykosid in Glykose und Phloretin. Phlorhizin findet sich in der Wurzelrinde der Obstbäume und in Blattknospen und Blättern von Pirus malus.

Der mikrochemische Nachweis des Phlorhizins wird durch die gleichzeitig anwesenden eisengrünenden Gerbstoffe beeinträchtigt und gelingt nach Herrmann (S. 21 der auf S. 220 gen. Dissert.) nur dort, wo Phlorhizin in großer Konzentration zugegen ist. Dies ist bei Pirus malus der Fall. Hier werden die phlorhizinhaltigen Zellen durch konz. Eisenchlorid rotbraun. Das Glykosid ist im äußeren Rindenparenchym lokalisiert, weniger in den Phloemstrahlen, nicht im Kambium, Bast und Holz. Im Zweige fallen die Reaktionen weit schwächer aus, ebenso im Blattnerv. Bei Pirus communis, Prunus domestica und cerasus gelangen die Reaktionen mit Eisenchlorid nicht, da „die Gerbsäure-Reaktion zu störend einwirkte“ (wahrscheinlich war kein Phlorhizin zugegen).

Bei einer Nachprüfung, die erforderlich ist, wäre zu versuchen: Entfernung des störenden, freien Gerbstoffes durch Wässern der Schnitte, dann Ammoniak, Ammoniakdampf, Kalilauge und Schwefelsäure.

Phloroglykotannoide und die sogenannten Inklusen.

Phloroglykotannoide (glykosidische Tannoide, die an Stelle eines Zuckers Phloroglucin führen) sind im Pflanzenreiche sehr verbreitet und kommen in der lebenden Zelle im Zellsaft vor. Besonders reichlich sind sie in der Rinde (Phloem- und Rindenparenchym) zugegen, dann im Mark, weniger im Holz, ferner in Laubblättern, Blüten, Früchten und Trichomen. Beim Absterben der Zellen zersetzen sie sich und bilden zum Teil wie die Gerbstoffe Phlobaphene; das ist bei der

[1]) M. Raciborski, Beiträge zur botanischen Mikrochemie. Bull. de l'Acad. de Cracovie, 1906, S. 553.

Borke und bei den Blättern der Fall. Die eben abfallenden Laubblätter geben noch die Vanillinsalzsäurereaktion (s. unt.), nicht aber das einige Zeit am Boden gelegene Laub und meist nicht die Borke. Lindt wies darauf hin, daß jene Blätter, die im Herbst Rotfärbung annehmen, die Reaktion in besonders starker Weise geben. Es wird hier jedenfalls schon eine Spaltung der Phloroglykotannoide derart eingetreten sein, daß der abgespaltene Nährstoff mit anderen Baustoffen in den Stamm abgewandert ist und nur die Phloroglucinderivate im Laube verbleiben. Waage meint, daß Phloroglucin sich aus Stärke und Zucker aufbaut und sich in großem Maße in aktiver Weise am Stoffwechselprozeß beteiligt. Er fand Neubildung von Phloroglucin beim Keimen der Samen und in Blättern, die auf Zuckerlösung schwammen. Neubildung eines Körpers beweist indessen noch nicht, daß der neugebildete Körper auch ein Baustoff ist: mit gleichem Recht kann er ein Abfallprodukt sein (Tunmann, Lit. S. 372, 1). Ähnliche Verhältnisse zeigen die Alkaloidpflanzen. Phloroglykotannoide finden sich zuweilen in großer Menge in den sezernierenden Zellen der Sekretbehälter und stehen mit der Genese des Sekretes in Beziehung, werden weiter zu harzigen Sekreten verarbeitet (Lit. S. 222, 4). Phloroglucinderivate finden sich in vielen Sekreten, es sei nur an die taeniciden Drogen (Rhiz. Filicis, Kamala, Flor. Koso) erinnert. Bei der Gummibildung ist ebenfalls Anhäufung von Phloroglykotannoiden beobachtet (beim Kirschgummi [1]) und in den Tarihülsen [2])).

Weselsky[3]) wies Phloroglucin mit Kaliumnitrat und Toluidinnitrat (oder Anilinnitrat) nach, wobei eine rote Diazoverbindung entsteht. Bei 0,0005 g Phloroglucin entsteht Gelbfärbung, bei 0,003 g nach 20 Minuten ein zinnoberroter Niederschlag. Eine ähnliche Reaktion gibt außerdem noch Catechin, Maclurin und ein Hopfenauszug. Die Methode Weselskys wurde von von Weinzierl[4]) mikrochemisch zum Nachweis des Phloroglucins in den Pflanzen benutzt. Lindt[5]) führte zum Nachweis die, seitdem so vielfach benutzte Vanillinsalzsäure (0,005 g Vanillin, 0,5 g Alkohol, 0,5 g Wasser, 3,0 g konz. Salzsäure) ein, da bekanntlich Phenole, in Salzsäure oder in Schwefelsäure gelöst, durch Aldehyde rot gefärbt werden. Phenol, Brenzkatechin, Resorcin, Hydrochinon, Digallussäure, Salicin, Cumarin, Aesculetin, Aesculin, Phlorhizin, Chinolin, Eiweiß sollten keine Reaktionen mit Vanillinsalzsäure geben, wohl aber Orcin. Vanillinsalzsäure gibt nun mit Phloroglucin eine hellrote, später violettrote, mit Orcin hingegen eine hellblaue

[1]) K. Mikosch, Unters. über die Entstehung des Kirschgummi, Sitzb. Wien. Ak., 1906, CXV, S. 926.

[2]) T. F. Hanausek, Über die Gummizellen der Tarihülsen, Ber. d. bot. Ges., 1902, XX, S. 82.

[3]) P. Weselsky, Ber. d. chem. Ges., 1876, IX, S. 216 u. 1879, XII, S. 226.

[4]) von Weinzierl, Öster. bot. Ztschr., 1876, XXVI, S. 285.

[5]) O. Lindt, Über den Nachweis von Phloroglucin, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1885, II, S. 495.

Farbenreaktion. Noch 0,000001 g Phloroglucin (trockene Substanz) ist mit Vanillinsalzsäure nachweisbar.

Die Lindtsche Angabe, daß Phlorhizin keine Reaktion mit Vanillinsalzsäure geben soll, erscheint von vornherein zweifelhaft und ließ seine anderen Befunde in dieser Hinsicht zweifelhaft erscheinen. In der Tat zeigte Waage[1]), daß mit Vanillinsalzsäure außer Phloroglucin und Orcin noch Resorcin und Pyrogallol reagieren, sowie nach Winckel[2]) noch Thymol, Kreosot, Cresorcin, Pyrogalloldimethyläther, Oxyhydrochinon, ferner Phlorhizin, Maclurin, Luteolin, Morin und Catechin. Moeller[3]) deutete die Reaktion auf Tannoide. Da zudem gewisse Eiweißkörper und Fermente ähnliche Farbenreaktionen geben, so ist bei der Deutung der Vanillinsalzsäurereaktion Vorsicht geboten. Immerhin ist das Reagens zum Nachweis von Phloroglucinderivaten brauchbar, zumal nach Hartwich und Winckel[4]) von den Tannoiden (in der Gruppierung von Kunz-Krause), die nicht glykosidischen Tannoide und die sich von der Dioxyzimtsäure ableitenden Tannoide (Coffea, Mate, Strychnos, Fabiana imbricata) keine Reaktion geben. Die Reaktion mit Vanillinsalzsäure tritt nur ein bei sämtlichen Phloroglykotannoiden und bei China- und Eichentannoid (möglicherweise sind diese beiden Tannoide ebenfalls Phloroglykotannoide).

Die Einwirkung der Vanillinschwefelsäure (s. S. 251) auf eine große Anzahl Substanzen haben Arnould und Goris[5]) studiert. Sie kommen zu dem Ergebnis, daß die durch das Reagens hervorgerufenen roten Färbungen Phenole anzeigen, die gelben Färbungen stickstoffhaltige Körper (meist der NH_2-Gruppe), und die violetten Färbungen zusammengesetzte Terpene.

Während nach Waage in den Pflanzen freies Phloroglucin auftreten sollte (das gebundene in Form von Phloro-gluciden und -glykosiden soll mit Vanillinsalzsäure nicht reagieren), Moeller anderseits das Vorkommen von Phloroglucin ganz in Abrede stellte und die Reaktion auf die Anwesenheit von Tannoiden gründete, beziehen wir jetzt die Reaktion mit Hartwich und Winckel auf Phloroglyko-

[1]) Th. Waage, Über das Vorkommen und die Rolle des Phloroglucins in der Pflanze, Ber. deutsch. bot. Ges., 1890, VIII, S. 250.

[2]) M. Winckel, Über das angebliche Vorkommen des Phloroglucins in den Pflanzen, Berner Dissertation, 1903.

[3]) H. Moeller, Über das Vorkommen von Phloroglucin in den Pflanzen, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1897, VII, S. 344.

[4]) C. Hartwich u. M. Winckel, Arch. d. Pharm., 1904, CCXLII, S. 462.

[5]) L. Arnould et A. Goris, Action du réactif sulfovanillique de Ronceray sur quelques composés chimiques et quelques végétaux, Bull. d. scienc. pharmacolog., 1909, XVI, S. 191.

tannoide. Die mit Vanillinsalzsäure rot (zinnober-, purpur-, karmin-, violettfarbig) werdenden Zellen geben somit gleichzeitig die Reaktionen auf Gerbstoffe und speichern in lebendem Zustande, wie schon Waage fand, Methylenblau. — In einigen Fällen tritt nur die Vanillinsalzsäurereaktion ein, während Gerbstoffreaktionen entweder negativ oder sehr unklar zu erzielen sind. Bei vielen Obstfrüchten und dem Rhizom von Acorus calamus erfolgt die Reaktion mit Eisenchlorid erst an getrocknetem Material, bei Acorus (Rhizom) aber auch bei frischem Material des Herbstes.

In Kürze sei darauf hingewiesen, daß der Vanillinsalzsäurereaktion eine diagnostische Bedeutung zukommt. Beimengungen von Ceratonia und Phoenix im Kaffee lassen sich sofort an der Rötung ihrer Inklusen (s. w. unt.) erkennen. — Nur das Sekret des Rhizoms von Alpinia galanga wird gerötet, nicht das von Curcuma longa, C. zedoaria, Zingiber officinale. — Von den Harzen geben die Reaktion Resina Draconis und Kino, welche bei der Kalischmelze Phloroglucin liefern, sowie die alkoholische Lösung der offizinellen Heerabolmyrrha, nicht die der Bisabolmyrrha (Hartwich und Winckel). — Das Reagens dient zur Unterscheidung der Bärentraubenblätter und ihrer Verwechselungen (S. 357), sowie der Frangularinde von der Rinde von Prunus padus (Tunmann). — Nach Arnould und Goris färbt sich die Rinde sämtlicher Coniferen und die von Thuja und vieler Rosaceen rot, einiger Ranunculaceen rosa; doch geben sehr viele Pflanzen und Harze keine Färbung.

Hierher zählen die vielfach untersuchten Einschlüsse vieler Früchte (Fruchtfleisch, Testa), die Tichomirow[1]) **Inklusen** genannt hat und deren Substanz zuerst von Hartwich und Winckel (a. a. O.) als Phloroglykotannoid aufgefaßt wurde. Zuerst wurden Inklusen bei Ceratonia siliqua L. und Rhamnus cathartica L. von Flückiger[2]) aufgefunden (bei Ceratonia entwicklungsgeschichtlich von Hällström[3]) untersucht), dann fand Braun[4]) dergleichen bei Phoenix dactylifera, wo sie Hanausek[5]) entwicklungsgeschichtlich verfolgte. Sie kommen ferner vor in den Früchten von Rhamnus- und Sorbus-Arten, von Mespilus germanica L. (Hanausek[6])), von Tamarindus (Vogl[7])) und in der Testa der

[1]) W. Tichomirow, Sur les inclusions intracellulaires du parenchyme charnu de la Datte, Bull. d. Congr. intern. d. Bot. de St. Pétersbg., 1885, S. 79.

[2]) F. A. Flückiger, Pharmakognosie, 1867, I. Aufl., S. 585.

[3]) K. H. Hällström, Zur Entwicklungsgesch. d. Fruchtwand von Ceratonia Siliqua L. u. Tamarindus indica L., Ber. deutsch. pharm. Ges., 1910, XX, S. 446.

[4]) Braun, Über das Vorkommen von Sphärokristallen aus Traubenzucker in den verschiedenen Drogen, Ztschr. d. allg. öster. Apoth.-Ver., 1878, XVI, S. 341.

[5]) T. F. Hanausek, Zur Kenntn. d. Anat. der Dattel und ihrer Inklusen, Pharm. Post, 1910, XLIII, S. 1041.

[6]) T. F. Hanausek in Wiesners Rohstoffe, 2. Aufl., II. Bd., S. 853.

[7]) A. Vogl, Kommentar z. öster. Pharmak., VI, 1880.

Pimentfrüchte (Schimper[1]). Tichomirow[2]) fand sie in Diospyros- und Anona-Arten, in Zizyphus vulgaris Lam., Elaeagnus angustifolius L., ferner in den Blättern von Rhamnus cathartica. Stscherbatscheff[3]) entdeckte dergleichen in der Fruchtwand von Glycyrrhiza. Ähnliche Körper scheinen in Sempervivum- und Echeveria-Arten vorzukommen.

Die Inklusen entstehen sehr frühzeitig, bei Ceratonia schon in 1 cm langen Früchten (Hällström), bei Blättern (Rhamnus) in der Knospe. Die betreffenden Idioblasten zeichnen sich in der Jugend durch große Zellkerne aus, sind plasmareich und heben sich vom benachbarten Parenchym durch ihre Größe ab (meist rundlich, doch auch länglich, sogar sehr langgestreckt): ihr Inhalt hat selbst in der lebenden Zelle ein starkes Lichtbrechungsvermögen. Plasmolysiert man die Protoplasten, dann läßt sich bei schnellem Zusatz von Vanillinsalzsäure oder Kalilauge (Natronlauge) eine rote (resp. eine blaue) Fällung mit Sicherheit in den Vakuolen verfolgen. Die Phloroglykotanniode bilden sich demnach in normaler Weise im Zellsaft. Dieselben zeigen jedoch bei den verschiedenen Pflanzen durchaus nicht übereinstimmende Zusammensetzung. Der gebundene Gerbstoff[4]) weist ein verschiedenes Verhalten auf, Eisenchlorid färbt teils blau (Ceratonia), teils grünlichschwarz (Phoenix). Doch kann die verschiedene Färbung bei der Eisenreaktion auf die Anwesenheit verschiedener Säuren beruhen (Zitronensäure s. Gerbstoffe, S. 253). An getrocknetem und konserviertem Material sind die Farben etwas verschwommen, die auch von der Dicke der Massen modifiziert werden. Des weiteren wechselt die Zusammensetzung der Substanz mit der Entwicklung; im allgemeinen ist sie in jugendlichen Organen lebhaft gefärbt und ist auch leichter löslich als in älteren. Ebenso variiert die Reaktion mit Millons Reagens; in jungen lebenden Idioblasten erzielt man sehr oft rote Färbung, bei Sempervivum fast stets, in alten überwiegend nur grünlichblaue Färbung. Auf diese Weise sind die Abweichungen beim Ausfall der einzelnen

[1]) A. F. W. Schimper, Anleit. z. mikrosk. Unters., 1888 S. 87.

[2]) W. Tichomirow, Sur les inclusions intracellulaires du parenchyme charnu de certains fruits: Datte, Kaki, Jujube, Anone et Chalef, Compt. rend., 1904, CXXXIV, S. 305, ferner Bull. d. l. soc. d. Naturalistes d. Moscou, 1905 und: Die johannisbrotartigen Interzellulareinschließungen im Fruchtparenchym mancher süßer Früchte usw., Moskau 1907 u. Compt. rend., 1907, CXLIII, S. 222.

[3]) D. Stscherbatscheff, Beitr. z. Entw. einiger offiz. Pflanz., Arch. d. Pharm., 1907, CCXLV, S. 48.

[4]) W. Tichomirow gibt freien Gerbstoff an, Zucker soll fehlen, hingegen Glykoside, Eiweiß und Fett oder Harz zugegen sein; letztere wurden mit Alkanna bei mehrmonatlicher (!) Einwirkung gefärbt.

Reaktionen zu erklären. Immer fallen aber die Hauptreaktionen annähernd übereinstimmend aus: die blaue bis rötliche Färbung mit Kali- oder Natronlauge, die übrigens von der Konzentration der Lauge (Solla[1])) und ebenfalls vom Alter der Inklusen bedingt wird, sowie die Rotfärbung mit Vanillinsalzsäure.

Während alle Autoren ihre Untersuchungen lediglich auf organische Körper der Inklusen ausdehnen, geht Solla außerdem auf anorganische Stoffe ein, gibt aber leider nur an, daß beim Glühen eine amorphe, aus organischer Substanz bestehende Masse zurückbleibt. In dieser Richtung sind weitere Untersuchungen erforderlich, die von Blättern der Frangula-, Echeveria- und Sempervivum-Arten (s. weiter unten) ausgehen müßten.

Der Vorgang der Inklusenbildung scheint nun folgender zu sein: In den Idioblasten werden mehr oder weniger große Mengen Phloroglykotannoide angehäuft und zunächst durch noch unbekannte Substanzen ähnlich wie Inulin in Lösung gehalten. Nun stirbt ziemlich schnell der Plasmaleib ab, seine Bestandteile gehen in der Hauptmasse zugrunde und der gesamte Inhalt erstarrt. Waren bei dem, möglicherweise durch Enzyme bewirkten. Erstarren große Mengen Phloroglykotannoide zugegen, dann bildet die Inkluse einen homogen soliden Ballen, während bei Gegenwart geringer Quantitäten der zentrale Teil mehr oder weniger weich ist oder auch fehlen kann (Säcke) und nur am Rande dichte Abscheidungen auftreten. Die erstarrten Inklusen lösen sich von der Membran ihrer Zellen ab, an ihrer Außenseite oft Membranabdrücke (Tüpfel) zeigend. Zuweilen scheint es zu einer undeutlich kristallinischen Ausscheidung zu kommen, indem Lamellen durch eine Beisubstanz verkittet werden (Fig. 94). —

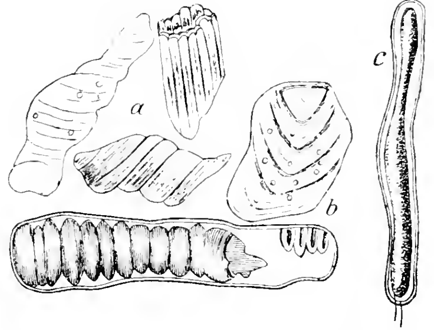


Fig. 94. Inklusen aus Rhamnus cathartica (a). Ficus carica (b). Phoenix dactylifera (c) (Tunmann).

In den Blättern der Sempervivum- und Echeveria-Arten fand Brenner[2]) vornehmlich subepidermal große stark lichtbrechende Zellen mit großen Zellkernen, kleinen und wenigen Chlorophyllkörnern. Gerb-

[1]) R. F. Solla, Sopra alcune speciali cellule nel carrubo, Malpighia, 1893, VII, S. 209.

[2]) W. Brenner, Untersuchungen an einigen Fettpflanzen, Basler Dissertation, 1900, S. 14.

stoffreaktionen fielen positiv aus. Schultzes Mazerationsgemisch gibt gelbe, Osmiumsäure schwarzgraue Färbung, Kupferoxydammoniak dunkelbraunen Niederschlag, Safranin und Cyanin werden gespeichert. Jod-Schwefelsäure gibt goldgelbe Klumpen, Kalilauge und Natronlauge blaue Ballen. Letztere werden durch Schwefelsäure entfärbt, es entsteht ein rotbrauner, schließlich dunkelbrauner Niederschlag. Salpetersäure, auch Essigsäure, färben die dunkelblauen Massen hellrot, hellviolett, braun, Borsäure schwarzblau, violett, braun. Sie reagieren nach Klemm[1]) mit Vanillinsalzsäure. Da sie aber Eiweißreaktionen (Raspailsche Reaktion) geben und da bei Sedum dendroideum ähnliche Zellen Gerbstoff-Reaktionen geben, aber nicht mit Natronlauge blaue Ballen liefern, so sollen die Reaktionen nach Brenner auf Eiweiß deuten.

Plumbagin.

Plumbagin, aus der Wurzelrinde von Plumbago europaea, nach Greshoff identisch mit dem Ophioxylin der Rinde von Rauwolfia serpentaria, ist ein wenig erforschter Pflanzenstoff, der möglicherweise in der Zelle in glykosidischer Bindung auftritt; er bildet nach Dulong d'Astafort in reinem Zustande gelbe prismatische Kristalle, die sich schwer in kaltem, leicht in heißem Wasser, Alkohol oder Äther lösen.

Mikroskopisch wurde Plumbagin von Herrmann (S. 32 der auf S. 277, 2 gen. Diss.) verfolgt, nach dem es in verschiedenen Plumbagineen auftreten soll, so in Pl. Lharpentae. In dieser und in Pl. europaea fanden sich bei Material aus dem Monat September im Zellinhalte in allen parenchymatischen Zellen (auch Markstrahlen, Phloemparenchym) der Wurzelrinde kleine, gelbe, sternförmig gruppierte Nadeln ausgeschieden. Diese Kristalle lösten sich nicht in Wasser, leicht in Alkohol und Äther mit gelber Farbe und in Alkalien mit intensiv roter Farbe. Bei Zusatz von Alkalien nahmen die Kristalle zunächst „eine blaue Färbung an, persistierten eine Weile und gingen nachher auch in Lösung“. „Auf genügenden Zusatz einer Säure, z. B. Essigsäure, ging nun die rote Färbung des Präparates und der umgebenden Lösung sofort in Gelb über.“ Die Angabe, daß Plumbagin in den unterirdischen Stengelteilen auch „in den stark verdickten Membranen der Bastfasern“ auftreten soll, erscheint zweifelhaft. Der Körper soll ferner in geringer Menge in den Blattnerven vorkommen.

Mir stand leider kein Material zur Verfügung, doch wird, falls Greshoffs Ansicht über die Identität des Plumbagins mit Ophioxylin zu Recht besteht, jedenfalls die Sublimation diagnostisch brauchbare Sublimate liefern.

[1]) P. Klemm, Über die Aggregationszustände in Crassulaceenzellen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1892, X, S. 237.

Populin.

Populin (Benzoylsalicin) besteht aus weißlichen, süßschmeckenden Nadeln von gerader Auslöschung, die sehr schwer in kaltem Wasser (in 2400 Teilen), schwer in Alkohol und in kochendem Wasser (in 42 Teilen), leicht in Äther, heißem Alkohol und in Eisessig löslich sind. Aus unreinen wässerigen Lösungen kristallisiert es in kleinen unvollkommenen Dreiecken, aus reineren Lösungen in strauchartigen Nadeln. Schwefelsäure löst es mit dunkelroter Farbe. Beim Kochen mit Kalk- oder Barytwasser wird es in Benzoesäure und Salicin, bei der Hydrolyse mit verd. Säuren in Glykose, Benzoesäure und Saliretin zerlegt. Populin ist typisch für P. candicans, P. tremula, P. graeca und P. alba, kommt auch in Salixarten vor (S. purpurea). Es tritt in Rinden, Knospen, Blättern auf, meist in Gemeinschaft mit Salicin. Etiolierte Schößlinge enthalten aber nur Salicin, kein Populin (Weevers). Theorin hält es für einen Reservestoff, da es beim Einstellen abgeschnittener Zweige von P. candicans in Wasser verschwand. Russell fand im Winter Anhäufung in den Wurzeln (Lit. S. 285, 1). In den Pflanzen wird Populin von Populase begleitet, als Endprodukt der Spaltung tritt in der Zelle Catechol auf (Weevers).

In der Pflanze hat Theorin[1]) Populin mit Hilfe von Schwefelsäure verfolgt. die eine dunkelrote Farbenreaktion gibt. Die gleiche Reaktion gibt Salicin, das häufig zugegen sein kann. Nun ist zu bemerken, daß Salicin in 28 Teilen kalten Wassers löslich ist. Man entfernt somit Salicin aus den Präparaten. indem man die Schnitte mit Wasser mazeriert und läßt erst auf diese Schwefelsäure einwirken. Doch wäre festzustellen, ob nicht beide Körper als Mischglykoside auftreten. Fehlingsche Lösung wird nicht reduziert. In Auszügen läßt sich Populin nach Hydrolyse durch Kochen mit verd. Salzsäure an dem einen Spaltling, Benzoesäure, nachweisen. Die mit Salzsäure gekochte Flüssigkeit wird neutralisiert, mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherauszug wird eingedunstet, der Rückstand sublimiert und die sublimierte Benzoesäure weiter charakterisiert (Weevers, Lit. S. 202, 2).

Rutin.

Rutin (Rutinsäure) bildet hellgelbe schwach glänzende Nadeln, die in kaltem Wasser, Äther, Azeton, Benzol fast unlöslich sind, sich hingegen leicht in kochendem Wasser, Alkohol, Eisessig und Alkalien lösen. Die Lösung in Ammoniak und in ätzenden Alkalien ist gelb, Eisenchlorid färbt Rutinlösung dunkelgrün. Bei der Hydrolyse mit verd. Schwefelsäure wird es in Glykose, Rhamnose und Quercetin gespalten. Rutin wurde aufgefunden in Quercus tinctoria (Rinde), Ruta graveolens, Fagopyrum esculentum (frische Blätter 1,78, frische Blüten 0,71, Stengel 0,09 %), Capparis spinosa (Blütenknospen), Viola tricolor

[1]) P. G. Theorin, Växtmikrokemiska Studier, Öfversigt af Kongl. Vetenskaps Akadem. Förhandlinger, 1884, No. 5, S. 51.

(Violaquercitrin), Sophora japonica (Blütenknospen, Sophorin) u. a. Zu den Quercetinglykosiden zählt eine große Anzahl weiterer Körper (Quercitrine), die in vielen Familien vorkommen, ganz allgemein in Ericaceen, Rhamnaceen u. a.

Zum mikrochemischen Nachweis benutzt man Ammoniak oder Kalkwasser, die rutinhaltige Zellen gelb färben. Läßt man die Präparate einige Zeit an der Luft, dann geht die gelbe Farbe in Braun über. Rutin findet sich nur in den Zellen „als Bestandteil des farblosen, flüssigen Zellinhaltes“, wie Herrmann[1]) bei Ruta graveolens beobachtete. Bei dieser Pflanze treten die genannten Reaktionen ein: in der Wurzel in zerstreut liegenden dünnwandigen Rindenparenchymzellen, in sämtlichen Zellen der Phloemstrahlen, nur schwach in den Xylemstrahlen und in der Nähe des Kambiums: im unteren stark verholzten Teil des Stengels außerdem noch in einzelnen Zellen des Markes, im oberen grünen Teil des Stengels im subepidermalen, chlorophyllführenden Gewebe und im Mark: im Blattnerv und im Blütenstiel nicht nur im Parenchym, sondern auch im stark verdickten Hypoderm.

Salicin.

Salicin (Leroux, 1830) bildet bitter schmeckende rhombische Nadeln, Blättchen oder säulenförmige Prismen, die sich in Wasser, Alkohol, Eisessig und Alkalien leicht lösen und in Chloroform und Äther unlöslich sind. Die wässerige Lösung wird mit Eisenchlorid braun. Bei der Spaltung durch Emulsin liefert es Traubenzucker und Salicylalkohol (Saligenin), der mit Eisenchlorid eine blaue Farbenreaktion gibt. Salicin ist gefunden worden in Salix pentandra, S. helix, S. praecox (Rinde und Blätter, in geringer Menge in Blüten); es wird für die Blütenknospen von Spiraea ulmaria (Buchner) und anderen Spiraeaarten, sowie für Crepis foetida (Wicke) angegeben. Im Tierreich hat es Wöhler im Castoreum nachgewiesen. — Nach Theorin[2]) soll Salicin (S. pentandra) beim Austreiben der Knospen verbraucht werden, eine Ansicht, die Weevers[3]) bestätigt fand, nach dem es in den Blättern am Tage gebildet wird, in der Nacht zum Teil wiederum verschwindet, während in der Rinde die Zunahme an Glykosid in der Nacht stattfindet. Das Endprodukt der Spaltung ist Catechol, welches in den Zellen verbleibt und zur Neubildung von Salicin dient. Russell[4]) findet Anhäufung in den unteren Stammteilen und in der Wurzel während des Winters.

[1]) O. Herrmann, Nachweis einiger organischer Verbindungen in den vegetabilischen Geweben. Dissertation Leipzig, 1876, S. 30.

[2]) P. G. Theorin, Pflanzenmikrochem. Studien, Sv. V. A. Öfvers, 1884, Nr. V, S. 51 und: Einige pflanzenmikrochemische Notizen, Sv. V. A. Öfvers, 1885, Nr. V, S. 29.

[3]) Th. Weevers, Unters. üb. d. Glykosidgehalt der Pflanzen in Verbind. mit dem Stoffwechsel, Pharm. Weekbl., 1902, Nr. IX, S. 57.

[4]) W. Russell, Compt. rend., 1904, CXXXIX, S. 1230.

Im Frühjahr wird es verbraucht. Bei der Spaltung des Glykosides und bei seinem Aufbau sind Oxydasen beteiligt (Weevers[1]).

Der erste Forscher, der sich mit dem Nachweis des Salicins befaßte, war wohl S. Raczinski[2]), der sich konz. Schwefelsäure bediente, wobei eine karminrote Färbung entstand. Das Glykosid sollte in den Zellwänden der Markstrahlen, des Holzes und der Bastfasern lokalisiert sein. Wenig später konnte Boguslawski[3]) die Reaktion nicht bestätigen und J. Babikoff[4]) erhielt zwar mit stark verdünnter Schwefelsäure (1 : 40,0 Wasser) Rotfärbung, aber nicht mit konz Säure, so daß er zur Ansicht gelangt, daß andere Substanzen die Reaktion bedingen. In neuerer Zeit hat man aber allgemein konz. Schwefelsäure herangezogen und die Rotfärbung stets auf Salicin gedeutet (Theorin[5]), 1884, Tschirch[6]), 1885, Rosoll[7]), 1889, Browns[8]), 1903). Linde (Apoth.-Ztg., 1905) machte darauf aufmerksam, daß man bei Cortex Salicis (Droge) eine völlig konz. Säure benutzen muß. Froehdes Reagens und Vanadinschwefelsäure färben violett. Goris (Lit. S. 341, 1) gebraucht eine Mischung von 2 g selensaurem Natrium und 2 ccm Schwefelsäure: nicht zu dünne Schnitte verbleiben kurze Zeit in der Lösung und werden dann ohne abzuwaschen in Glyzerin übertragen.

Die kritischen Prüfungen von Weevers[9]) lassen nun vermuten, daß die genannten Reaktionen auch durch Phytosterine verursacht werden. Da Emulsin in den unangeschnittenen Zellen keine Spaltung des Glykosides herbeiführt (da es nicht eindringt), so extrahiert man die Gewebe durch Auskochen mit Wasser, läßt das Extrakt nach Abkühlung mit Emulsin versetzt 24 Stunden stehen, schüttelt alsdann mit Äther aus, engt den Ätherauszug ein und erhält im Verdunstungsrückstand den Spaltling des

[1]) Th. Weevers, The phys. significance of cert. glucosides, Proc. Kon. Ak. v. Wet., Amsterdam, 1909.

[2]) S. Raczynski, Not. sur la distribution d. la salicine dans les tissus des saules, Bull. d. l. soc. imp. Moscou, 1866, Nr. 3.

[3]) Boguslawski, Bull. d. la soc. imp. Moscou, 1869.

[4]) J. Babikoff, Über d. Vorkommen d. Salicins in den Weiden, St. Petersburger Ges., 1874, V, S. 1.

[5]) P. G. Theorin, Pflanzenmikrochem. Studien, Sv. V. A. Öfvers, 1884, Nr. V, S. 51.

[6]) A. Tschirch, Beitr. z. K. d. mechan. Gewebesyst. d. Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1885, XVI, S. 303.

[7]) A. Rosoll, Über d. mikr. Nachw. d. Glyk. u. Alkal. in den vegetabilischen Geweben, 25. Jahrber. d. Gymn. Stockerau.

[8]) D. Browns, Lokalisation des Salicins, Pharm. Journ., 1903, S. 558.

[9]) Th. Weevers, Die physiologische Bedeutung einiger Glykoside, Jahrb. f. wiss. Bot., 1904, XXXIX, S. 229.

Glykosides, das Saligenin, in Gestalt farbloser Rauten, die stark polarisieren, schief auslöschen und unzersetzt sublimieren. Sie geben mit Bromwasser feine gelbe Nadeln von gerader Auslöschung und mit Kupferazetat in verdünnter alkoholischer Lösung beim Erwärmen bei Zusatz von Ammoniumkarbonat gelbe Tropfen, aus denen sternförmig gruppierte grüne Nadeln anschießen. Fehlingsche Lösung wird weder durch Salicin noch durch Saligenin reduziert. Beim langsamen Trocknen wird ein Teil des Glykosides zersetzt.

Saponine.

Als Saponinglykoside[1]) bezeichnet man stickstofffreie Glykoside, deren wässerige Lösungen stark schäumen, kratzend schmecken, fein verteilte Substanzen am Absetzen hindern, schwer dialysieren und rote Blutkörperchen auflösen; sie sind meist amorph. Ihre Konstitution ist noch nicht genügend erforscht. Bei der Spaltung liefern sie neben (bisweilen) kristallinischen Sapogeninen teils Hexosen, teils Pentosen oder Methylpentosen. Gepulverte Saponine erregen Niesen. Die mehr oder weniger giftigen Saponine finden sich im ganzen Pflanzenreich verbreitet. Bei Kryptogamen hat man sie noch nicht beobachtet, bei den Monokotylen zeichnet sich die Familie der Liliaceen durch Saponinpflanzen aus. Sie finden sich in ungefähr 70 Familien: Liliaceen, Chenopodiaceen, Caryophyllaceen, Ranunculaceen, Rosaceen, Saxifrageen, Mimoseen, Papilionaceen, Sapindaceen, Rhamnaceen, Araliaceen, Primulaceen, Caprifoliaceen, Compositen u. a. Schaer hat darauf aufmerksam gemacht, daß in 22 Familien Saponine zugleich mit Blausäureglykosiden vorkommen, in Araceen, Bixaceen, Combretaceen, Compositen, Gramineen, Magnoliaceen, Papilionaceen, Ranunculaceen, Rosaceen, Saxifrageen, Sapindaceen, Sapotaceen u. a.[2]).

Die Saponine kommen, im Zellsaft gelöst, in allen Teilen der Pflanzen vor, besonders reichlich in Wurzeln, Rinden und Früchten. Beim Absterben der Zellen scheiden sie sich als amorphe Ballen und Klumpen im Zellinhalte ab, ohne die Membran zu durchtränken. Russell (Lit. S. 285, 1) fand Anhäufung der Saponine zur Winterszeit in den unterirdischen Reservebehältern. Nach Weevers[3]) werden sie im Samen der Roßkastanie bei der Keimung verbraucht (Reservestoffe). Saponine sind Schutzwaffen der Pflanzen. Sie treten bisweilen in relativ großen Mengen auf, Saponaria off. (Wurzel) 13—15 %, Quillaja sap. (Rinde) 8—9 %, Aesculus hipp. (Kotyledonen) 10 %, Polygala senega (Wurzel) 10 %.

Wir verfügen zum mikrochemischen Nachweis über einige Gruppenreagentien, doch erscheint es fraglich, ob sich alle Saponine mit diesen nachweisen lassen. Spezialreagentien fehlen oder sind

[1]) Näheres bei R. Kobert (Die Saponine, 1904), bei E. Schmidt, Pharm. Chem., Czapek, Biochemie u. a.

[2]) Ed. Schaer, Schw. Wochenschr. f. Chem. u. Pharm., 1910, XLVIII, S. 645.

[3]) Th. Weevers, Die physiologische Bedeutung einiger Glykoside, Jahrb. f. wiss. Bot., 1904, XXXIX. S. 243.

mikrochemisch noch nicht genügend überprüft. Liegen Herbarpflanzen oder Drogen vor, die zum Schneiden nicht in Wasser aufgeweicht werden dürfen, sondern trocken oder nach dem Liegen in feuchter Kammer geschnitten werden, dann präpariert man zunächst in konzentriertem Glyzerin oder Alkohol (auch in Öl). Die saponinhaltigen Zellen zeigen amorphe Klumpen oder Schollen, die bei gesteigertem Wasserzusatz zu den Präparaten in Lösung gehen. Umgekehrt kann man bei lebendem Material das Saponin, das übrigens überall dort, wo es in großer Menge auftritt, den Zellsaft zähflüssig macht, durch absoluten Alkohol zur Ausscheidung bringen. Kristallinische Ausscheidungen (herrührend von Sapogeninen) sind noch nicht beobachtet worden. Doch wären eingehende Beobachtungen über die Wirkung der Plasmolyse wünschenswert.

Konz. Schwefelsäure gibt mit Saponinen im Gewebe eine charakteristische Farbenreaktion (gelb, dann rot, schließlich violett, A. Rosoll[1])). Die Farbenumschläge treten in verschiedener Zeit ein. Bei der Wurzel von Polygala senega (Radix senegae) werden durch konz. Schwefelsäure (verholzte Membranen grünlich) die Saponinzellen sofort gelb. Erst nach $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde entsteht eine rote Färbung (die verholzten Membranen sind inzwischen blaugrün geworden), die jetzt bald in Violett übergeht. Bei ganz gelindem Erwärmen tritt die violettrote Farbe sofort ein. In der Senegawurzel sind die Saponine im Parenchym der Rinde, in den Markstrahlen des Holzes und im anormalen Holz lokalisiert (Tunmann)[2]), bei Saponaria officinalis L. und Gypsophila struthium L. im Parenchym der Mittelrinde, in den Markstrahlen und im Holzparenchym der Wurzeln und Stengeln, bei Quillaja saponaria im Parenchym der Mittelrinde (A. Rosoll).

Die Schwefelsäure wird man zuweilen vorteilhaft mit anderen Stoffen verbinden (Ammoniumvanadat, Selenige Säure u. a.) und so abweichende Färbungen erreichen. Ob die Schwefelsäure-Reaktion nur den Saponinen zukommt, ist in neuester Zeit fraglich geworden, da A. W. van der Haar in Hedera helix ein flüchtiges, terpenartiges Produkt isoliert hat, welches Sapogenin-Reaktion gibt (Arch. d. Pharm., 1912, CCL, S. 424). — Nesslers Reagens (S. 113) gibt in Saponinzellen sofort Niederschläge. Diese sind so stark, daß das mikroskopische Bild ganz unklar wird. Die Färbung schlägt innerhalb 10

[1]) A. Rosoll, Üb. d. mikrochem. Nachw. d. Glykos. u. Alkal. i. d. vegetabil. Geweb., 25. Jahrber. Gymnas. Stockerau, 1890, S. 11 und: Beiträge z. Histochemie der Pflanzen, Sitzber. Wien. Akad., 1884, LXXXIX, 1. Abt., S. 143.

[2]) O. Tunmann, Üb. eine Beimeng. d. Senegawurzel, Pharm. Zentralh., 1908, XLIX, S. 63.

bis 12 Stunden mehrmals um (gelb, rotbraun, grau, schwarz) und ist makroskopisch (beim Halten der Präparate über eine weiße Unterlage) sehr gut sichtbar. Doch kommt Nesslers Reagens als Hilfsreaktion nur bei Abwesenheit von Ammoniumverbindungen in Betracht (S. 114, 2).

Hanausek[1]) übertrug die Lafonsche Digitalinreaktion (Journ. Pharm. Chim. 1885, S. 71) auf das mikrochemische Gebiet. Die Präparate kommen in ein Gemisch von gleichen Teilen Alkohol und konzentrierter Schwefelsäure. Beim Erwärmen tritt eine rotviolette Färbung in den Saponinzellen auf, bisweilen auch nach einiger Zeit in der Kälte. Fügt man einen Tropfen Eisenchlorid (das offizinelle Präparat) hinzu, so bildet sich ein bräunlichblauer Niederschlag. Die Stärke des Niederschlages ist abhängig von der Menge des anwesenden Saponins

Die Saponine gaben bei einigen Objekten folgende Reaktionen (Hanausek):

	Alkohol-Schwefelsäure a) kalt	b) warm	Präparate von b m. verd. Eisenchl.
Agrostemma gith. (Embryo)	gelbgrün, $+H_2O$ goldgelb	violett	braunblauer N.
Dianthus carthus. (Embryo)	gelbgrün	ziegelrot	hellbraun. N
Sapindus sapon. u. escul. (Perikarp)	keine Färb.	dunkelviolett	bräunl. N.
Saponar. rubr. (Rinde) . . (Holz keine Reakt.)	blaßgelb	rosenrot-violett	rötlich. N.
Sapind. sapon. (Rinde u. Holz)	gelb	rot	in Rinde braun. N
Polygal. senega (Rinde) . (Holz keine Reakt.)	zitronengelb	blutrot-violett	blauer N.
Polygal. major (Wurzelrinde)	goldgelb	blutrot-violett	braunblauer N
„ amara „	blaßrötlich	violett	braun. N.
Quillaja sapon. (Rinde) . .	blaßgelb	rötlich violett	bräunl. N.

Die angeführten Reaktionen haben den Nachteil, daß Zucker, Gerbstoffe, Alkaloide u. a. mehr oder weniger mit in Reaktion treten können. Bei der Schwefelsäurereaktion tritt der Übelstand hervor, daß mit Zucker und dem plasmatischen Eiweiß die Raspailsche Reaktion zustande kommt. Daher empfahl Rosoll Kontrollschnitte mit Schwefelsäure zu studieren, denen man durch Auskochen mit Wasser die Saponine entzogen hat. Da aber hierbei der Zucker gleichzeitig ausgezogen wird, so nützen die Kontrollschnitte wenig. Bei einiger Übung bieten bereits die Farbenübergänge (gelb, rot, violett), die Zucker-Plasma-Schwefelsäure nicht geben, genügenden Anhalt. Es

[1]) T. F. Hanausek, Zur Kenntnis des Vorkommens u. Nachweises der Saponinsubstanzen im Pflanzenkörper, Chem. Ztg., 1892, XVI, S. 1295.

empfiehlt sich, die Farbenreaktionen makroskopisch zu kontrollieren (Halten der Objektträger über eine weiße Unterlage).

Etwas umständlicher und nur wenig bessere Resultate liefernd, ist die Methode von Combes[1]). Sie ist für Dauerpräparate zu empfehlen. die Lokalisation kann mit den anderen Methoden ebenso sicher ermittelt werden. Die Präparate werden 24 Stunden mit gesättigtem Barytwasser mazeriert, wodurch eine in Wasser schwer lösliche, gelatinöse, farblose Saponinbarytverbindung entsteht. Das überschüssige Barytwasser wird mit Kalkwasser entfernt. Durch eine 10%ige wässerige Lösung von Kaliumdichromat wird die Saponinbarytverbindung zersetzt und das Baryum in den Saponinzellen in gelbes unlösliches Baryumchromat übergeführt. Gerbstoffhaltige Zellen werden hierbei nur braunrot (Niederschlag) und geben keinen Anlaß zur Verwechslung mit den Saponinzellen. Werden aber die mit Barytwasser mazerierten Schnitte statt mit Kalkwasser mit reinem Wasser ausgewaschen, dann geht die Barytverbindung der Saponine in Lösung. Combes untersuchte Gypsophila, Saponaria, Arum, Aesculus, Anagallis, Digitalis.

Die Saponine sind in allen Fällen in den Parenchymzellen lokalisiert, vornehmlich in der Rinde, doch auch im Mark und in den Markstrahlen.

Im Samen von Nigella sativa findet sich Melanthin, das nach v. Schulz ein Saponin ist. Vanderlinden (Lit. S. 287, 1) erhielt im Bast der Wurzel eine rote Färbung mit konz. Schwefelsäure, die nur kurze Zeit beständig ist. Schwächer tritt die Reaktion im Endosperm ein. Die vegetativen Teile geben die Reaktion nicht.

Saponarin.

Saponarin, eine noch wenig erforschte Substanz, soll nach Barger[2]) ein Glykosid sein, der Spaltling soll ein Flavonderivat darstellen. Saponarin ist (neben Narcein) einer der wenigen Körper, welche ebenso wie die Stärke mit Jod eine Blaufärbung mit Abtönungen von Rot bis Violett gibt. Daher wurde mikrochemisch die Reaktion anfangs auf „lösliche Stärke“ gedeutet. Doch schon Naegeli[3]) vertrat die Ansicht, daß die Reaktion nicht auf Kohlehydrate hinweise und Kraus[4]) stellte den Körper zu den Gerbstoffen, da er eine braungrüne Eisenreaktion

[1]) R. Combes, Sur une méthode générale de recherches microchimiques et son application à l'étude de la répartition des saponines chez les végétaux, Compt. rend., 1908, CXLV, S. 1431.

[2]) G. Barger, Ber. chem. Ges., 1902, XXXV, S. 1296.

[3]) C. Naegeli, Beitr. wiss. Bot., II, S. 187.

[4]) G. Kraus, Abh. naturforsch. Ges. Halle, 1885, XVI, S. 372.

erhielt. Dufour verdampfte die wässerige Lösung zur Trockne und erhielt Sphärokristalle.

Saponarin ist im Zellinhalte lokalisiert, vornehmlich in der Epidermis. Es kommt vor in Caryophylleen (Saponaria officinalis L., Gypsophila-Arten, Tunica saxifraga Scop.), Cruciferen (Alliaria officinalis), Papilionaceen (Orobus vernus L.)[1]), Malvaceen (Hibiscus syriacus), Sterculiaceen (Cola acuminata, obere Epidermis), Cucurbitaceen (Bryonia dioica), Compositen (Centaurea paniculata), Liliaceen (Gagea lutea, Ornithogalum-Arten), Gramineen (Hordeum-Arten, Bromus erectus), sowie in einem Lebermoos, Madotheka platyphylla[2]).

Dufour[3]) wies das Saponarin (die lösliche Stärke) nach, indem er Flächenschnitte von Saponaria officinalis mit Jodtinktur versetzte. Nach dem Verdunsten des Alkohols bilden sich am Deckglasrande teils amorphe blaue Niederschläge, teils sternförmig gruppierte Kristallnadeln. Läßt man Jodreagentien (Jod in Glyzerin, Chloroform, Benzin, Schwefelkohlenstoff, Äther oder Jodjodkalium) ganz langsam auf Flächenschnitte einwirken, dann bilden sich blaue Kristallnadeln, die meist in, bis 100 μ langen Gruppen vereinigt sind und sich in Alkohol, Wasser, Glyzerin, Säuren und Alkalien leicht, in Äther, Benzin und Chloroform schwer lösen. Ammoniak löst sie unter Gelbfärbung. Mit der Stärke teilt Saponarin die Eigenschaft, daß die blaue Färbung beim Erwärmen verschwindet, um beim Erkalten der Präparate wieder einzutreten. Da Barger (a. a. O.) sein Saponarin nur bei Saponaria officinalis näher studierte, so ist es noch unsicher, ob in allen Fällen der gleiche Körper vorliegt, oder ob wir es mit einer Gruppe ähnlicher Substanzen zu tun haben[4]).

Senf- und Lauchölglykoside.

Die Senföle treten in der Pflanze als Glykoside auf, aus denen sie durch Enzyme (Myrosin, s. d.) abgespalten werden. Enzyme und Glykoside sind in den Zellen getrennt lokalisiert. Erst bei Verwundungen treten die Enzyme zu den Glykosiden und spalten bei Gegenwart von Wasser die stark riechenden, Schwefel und Stickstoff führenden Senföle ab. Die Senfölglykoside sind aus diesem Grunde als Schutzmittel gegen tierische Feinde angesprochen worden. Doch betont Verschaffelt, daß Pieris-Raupen mit Vorliebe Pflanzen fressen,

[1]) C. Sanio, Bot. Ztg., 1857, XV, S. 420, J. Dufour, Arch. scienc. phys. et nat. Génève, 1886, XV, S. 437, P. Guérin, Bull. soc. bot., 1897, IV, S. 91.

[2]) H. Molisch, Ber. deutsch. bot. Ges., 1911, XXIX, S. 487.

[3]) J. Dufour, Rech. sur l'amidon soluble et son rôle physiologique chez les végétaux, Bull. Soc. vaudoise des sc. nat., 1886, XXI, Sep.

[4]) Vergl.: A. Fernbach, S. nouv. forme d'amidon soluble, Compt. rend., 1912, CLV, S. 617.

die Senföle enthalten[1]). Durch Anästhetika und Frost kann die Spaltung an lebenden Pflanzen hervorgerufen werden (L. Guignard, Compt. rend., 1909, CXLIX, S. 91). — Über die Verbreitung der Senfölglykoside s. Myrosin.

Sinigrin.

Sinigrin (Myronsäure, Bussy, 1840, Gadamer u. a.) tritt als Kaliumsalz auf und kristallisiert aus Alkohol in kleinen Nadeln, aus Wasser in kurzen Säulen. Die Kristalle lösen sich leicht in Wasser, schwer in verd. Alkohol, wenig in absolutem Alkohol, nicht in Äther und Chloroform. Bei der Spaltung bilden sich Glykose, saures Kaliumsulfat, Allylsenföl; da letzteres sehr leicht vom Wasser angegriffen wird, so entstehen in geringer Menge sekundäre Nebenprodukte (Schwefelkohlenstoff, Schwefel u. a.). Sinigrin findet sich in vielen Cruciferen, besonders in der Wurzel von Cochlearia armoracia und in Samen (Sinapis nigra, S. glauca, S. juncea, Brassica rapa u. a. bis zu 3,7%). Das Cheirolin der Samen von Cheiranthus cheiri steht dem Allylsenföl von Brassica nigra nahe und kommt in der Pflanze wahrscheinlich ebenfalls als kaliumhaltiges Glykosid vor (Schneider, 1910).

Zum mikrochemischen Nachweis des Sinigrins brachte Guignard[2]) die Präparate in eine Weinsäurelösung. Da Sinigrin kaliumhaltig ist, so müssen sich in den Sinigrinzellen Kristalle von Kaliumtartarat bilden. Diese entstehen auch in schöner Weise, liegen aber um das Präparat herum in der Flüssigkeit, weniger über dem Präparate und selten in den Sinigrinzellen (S. 108, Fig. 27). Die Reaktion wird ferner dadurch wenig brauchbar, daß außer dem Kalium des Sinigrins auch das Kalium anorganischer Verbindungen in Reaktion tritt. Eine Trennung des glykosidischen Kaliums von den übrigen Kaliumverbindungen (Kaliumsulfat, Kaliumchlorid) ist schwer durchzuführen, da das Glykosid sehr leicht wasserlöslich ist. Besser läßt sich das Kalium mit Platinchlorid nachweisen. Bei Präparaten des Meerrettich (das beste Versuchsobjekt) entstehen die bekannten Kristalle von Kaliumplatinchlorid zwar auch im Beobachtungstropfen und auf dem Präparate, doch auch in den Zellen sind sie zu finden.

Brauchbarer ist das Verfahren, das myronsaure Kalium in Allylsenföl überzuführen und letzteres mit Alkanna nachzuweisen. Immerhin erfordert auch diese Methode Guignards, an Samen wenigstens, einige Übung. Zunächst werden die fetten Öle mit Äther entfernt. Das Sinigrin bleibt in den Zellen ungelöst zurück, doch wird gleichzeitig das Myrosin fixiert und abgetötet. Zur Spaltung des Glykosides muß somit eine Myrosinlösung zugesetzt werden. Man benutzt

[1]) E. Verschaffelt, Die Ursache der Nahrungswahl bei einigen pflanzenfressenden Insekten, Versl. Kon. Ak. Wet. Amsterdam, 29. X. 1910.

[2]) L. Guignard, Sur la localisation des principes qui fournissent les essences sulfurées des Crucifères. Compt. rend., 1890, CXI, S. 249.

hierzu eine aus schwarzen Senfsamen oder aus den Flügeln der Samen von Lunaria biennis frisch bereitete Lösung (s. Myrosin). Nun ist zu beachten, daß die Präparate wenigstens 10—20 Minuten in der Myrosinlösung verbleiben und zwar bei einer Temperatur von mindestens 50° (schwaches Erwärmen). Die Präparate werden dann herausgenommen, mit Wasser abgespült und auf dem Objektträger in einen Tropfen Alkannatinktur gelegt; nach 2—3 Minuten wird die Alkannatinktur abgesaugt und durch Glyzerin ersetzt. In den Sinigrinzellen, d. s. die meisten Parenchymzellen, erscheinen jetzt kleine tiefrot gefärbte Tröpfchen von Allylsenföl, die mit Äther entfettete, aber nicht mit Myrosin behandelte Präparate nicht zeigen. Man stelle die Reaktion erst an Präparaten des Meerrettich an, bei Cruciferensamen ist sie weniger deutlich.

Dem Sinigrin nahe stehende Glykoside kommen mehrfach vor, doch sind sie noch wenig erforscht und liegen meist nicht, soviel bis jetzt bekannt, als Kaliumverbindungen vor. Ein solches Glykosid findet sich in Cochlearia officinalis. Dasselbe wird durch Myrosin in Butylsenföl und in noch unerforschte Spaltlinge zerlegt. Seine Lokalisation ist nach der oben angegebenen Methode von Guignard zu ermitteln. Das gleiche ist bei allen Objekten der Fall, bei denen Senföle in glykosidischer Bindung auftreten.

Sinalbin.

Das Senfölglykosid der Samen von Sinapis alba, das Sinalbin, ist erst in neuerer Zeit von Will und Laubenheimer in kristallinischer Form isoliert worden. Es löst sich leicht in Wasser und in heißem 85%igen Alkohol. In kaltem 85%igen und in absolutem Alkohol, sowie in Äther und in Schwefelkohlenstoff ist es unlöslich. Durch Myrosin zerfällt es in Glykose, saures schwefelsaures Sinapin und Sinalbinsenföl.

Sinalbin läßt sich nach der Guignardschen Methode (S. 393) nachweisen, indem man die mit Äther entfetteten Präparate des Keimlings mit Myrosin behandelt und das frei gewordene Senföl mit Alkannatinktur färbt. Des weiteren kann man nach Hartwich und Vuillemin[1]) Millons Reagens benutzen. Hierbei färben sich allerdings die Myrosinzellen ebenfalls mit, doch erscheinen diese nach einiger Zeit mehr violett. Diese Reaktion ist auch von praktischer Bedeutung, da es mit ihr gelingt, die zuweilen übliche Beimischung von Sinapis alba und arvensis im Pulver von Brassica nigra leicht und schnell zu ermitteln (Sinigrin reagiert nicht mit Millon).

Als Hilfsreaktionen[2]) erscheinen die nachstehenden nicht ungeeignet.

[1]) C. Hartwich u. A. Vuillemin, Beiträge zur Kenntnis der Senfsamen, Apoth. Ztg., 1905, XX, Sep. S. 22.

[2]) Die Reaktionen von R. F. Solla (Über zwei wahrscheinliche mikrochemische Reaktionen auf Schwefelcyanallyl, Bot. Centralbl., 1884, XX, S. 342)

Konzentrierte Salpetersäure ruft sofort eine gelbrote Färbung hervor. Die Farbe verblaßt innerhalb einer Minute. Die Samenschale bleibt dabei unverändert. Mit Kalilauge entsteht im Keimling eine tieforange Färbung, die Samenschale bleibt unverändert. Bei gelindem Erwärmen geht die orange Färbung der Sinalbinzellen in ein leuchtendes Braunrot über, während die Samenschalen jetzt schwach gelblich werden. Bei beiden Reaktionen treten die Fetttropfen ungefärbt aus den Präparaten hervor[1]).

Lauchölglykoside.

Den Senfölen stehen in chemischer und physiologischer Hinsicht die Lauchöle nahe. Möglicherweise entstehen sie aus frei gewordenen Senfölen, worauf die Tatsache hindeutet, daß junge Pflänzchen von Alliaria officinalis nur Senföle, ältere daneben auch Knoblauchöl enthalten (Wertheim, 1844).

Mikrochemisch hat Voigt[2]) das Knoblauchöl im Gewebe verfolgt, indem er größere Pflanzenstücke in wässerige Lösungen von Palladiumoxydulnitrat (in wasserheller Verdünnung) oder von Silbernitrat (1 bis 2 $^0/_0$) einlegte. Durch Evakuieren wurde das Eindringen der Lösungen beschleunigt. Nach dem Abspülen kamen die Pflanzenstücke zur Härtung in absoluten Alkohol. Nun wurden die Präparate hergestellt. Außerdem wurden dünne Epidermisstücke und unter Wasser hergestellte Präparate direkt auf dem Objektträger in die betreffenden Reagentien eingelegt. Untersucht wurden Allium cepa, sativum, porrum (Fig. 95), schoenoprasum, moly, victorialis, ursinum, fistulosum, urceolatum, coerulescens. Das Öl fand sich in der Epidermis (Stengel, Blätter, Zwiebelschuppen), Gefäßbündelscheide (Blüten), in den Durchlaßstellen der äußeren Endodermis (Wurzeln), ferner im Endosperm in der den Embryo umgebenden Zellschicht, sowie in Samen- und Fruchtschalen.

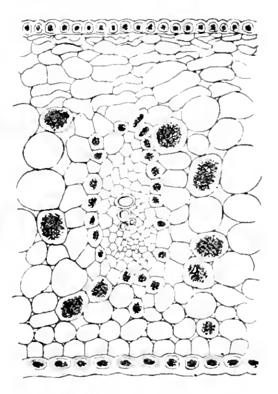


Fig. 95. Allium porrum (Blattbasis, Querschnitt). Die schraffierten Zellen führen die Glykoside (Tunmann).

basieren auf falschen Voraussetzungen und wurden bereits von E. Bachmann (Ztschr. f. wiss. Mikr., 1885, II, S. 261) als unbrauchbar bezeichnet.

[1]) Chemisch reines Sinalbin wird durch kleinste Mengen Alkali intensiv gelb, durch Salpetersäure rot.

[2]) A. Voigt, Lokalisierung des ätherischen Öles in den Geweben der Allium-Arten, Jahrb. Hamburger Anst., 1889, XXXVI, S. 391.

Syringin.

Syringin (Bernays, 1841) bildet farblose lange Nadeln, die in kaltem Wasser sehr schwer, in heißem Wasser und in Alkohol leicht, in Äther nicht löslich sind; konz. Schwefelsäure färbt blau, dann violett, Salpetersäure rot. Bei der Hydrolyse entsteht amorphes rotes Syringenin und Glykose. Syringin tritt auf in: Syringa vulgaris, Ligustrum vulgare, Robinia pseudacacia, Jasminum undiflorum und fruticans. Schell[1]) hielt es bereits für einen Baustoff, der zur Bildung von Kohlehydraten dient. Nach Vintilesco[2]) tritt es am reichlichsten während der Vegetation auf und nimmt beim Blattfall ab; in alten abfallenden Blättern fehlt es.

Eine richtige Angabe über die Lokalisation des Syringins findet sich schon bei Schell. Benutzt wird konz. Schwefelsäure (Blaufärbung); setzt man den in Säure liegenden Schnitten Alkohol zu, dann schlägt die blaue Färbung in Rot um. Die späteren Beobachtungen von Borscow[3]) sind unrichtig, gingen aber als feststehend in die Literatur über. Nach Borscow, der Schwefelsäure mit 2 Teilen Wasser verdünnt benutzt, sollen alle verdickten Membranen des Holzes und der Rinde glykosidhaltig sein. Vorteilhaft legt man Schnitte lebenden Materials direkt in konz. Säure oder in schwach verd. Säure (1 + 1 Teil Wasser) und beobachtet sofort. Der Inhalt der Parenchymzellen wird zunächst gelbgrün, nach einigen Minuten indigoblau gefärbt. Der Farbstoff wird nun schnell von den verholzten Membranen, besonders von den Bastfasern gespeichert und führt so zu der (irrigen) Ansicht, Syringin sei in der Membran lokalisiert, was aber nicht der Fall ist, da die Wände sämtlicher Zellen meist ungefärbt bleiben. Nur bei Zusatz einer größeren Säuremenge und bei reichlichem Glykosidgehalt geht die blaue Färbung in Violett über. Auch Salpetersäure läßt sich benutzen, doch entsteht nur selten eine rote Färbung, gewöhnlich infolge geringen Glykosidgehaltes eine mehr gelbbraune bis braunrote Färbung, ebenfalls zuerst im Zellinhalte. Andere makrochemische Methoden (Kaliumpermanganat, Chromsäure) lassen sich zum mikrochemischen Nachweis nicht verwenden.

[1]) J. Schell, Über das Syringin, Arb. Naturf. Vers. Kasan, II, 1873 (russisch), Ref. Just Jahrb., 1873, S. 596.

[2]) J. Vintilesco, Rech. biochim. sur quelques sucres et glucosides, Thèse Doct. Scienc. nat., Paris 1911.

[3]) El. Borscow, Beiträge z. Histochem. d. Pflanz., Bot. Ztg., 1874, XXXII, S. 17.

Strophanthin.

Strophanthin, von Fraser 1874 entdeckt, findet sich in verschiedenen Strophanthus-Arten (Str. kombe, Str. hispidus) besonders, aber nicht ausschließlich, im Samen (bis zu 6%) (W. Karsten, Ber. d. pharm. Ges., 1892, XII, S. 245). In Nerium oleander (Algier) soll ein sehr nahe stehender Körper auftreten (A. Leulienr, Journ. de Ph. et de Ch., 1911). Das in Wasser und Alkohol leicht lösliche Glykosid liefert bei der Hydrolyse kristallinisches Strophanthidin und Zucker.

Zum mikrochemischen Nachweis wurden die Reaktionen von Helbing (Pharm. Journ. and Transact. 1887, S. 924) benutzt. Eisenchlorid-Schwefelsäure sowie Schwefelsäure. Man läßt den Schnitt in etwas Eisenchlorid vollsaugen und überträgt ihn in Schwefelsäure: es entsteht ein rotbrauner, meist schwer wahrnehmbarer Niederschlag, der nach längerer Zeit (1—3 Stunden) grün wird. Besser wirkt Schwefelsäure allein, die man jetzt ausschließlich anwendet; es tritt für kurze Zeit eine blaue Färbung ein, die bald in Grün übergeht. Die Reaktion wird durch die Stärke der Schwefelsäure beeinflußt (Gordon Sharn): man bedient sich einer etwas verd. Säure (3 Gew. T. Säure, 1 Gew. T. Wasser) und gibt diese auf den trockenen Schnitt. Bei der Gehaltsprüfung wird die Reaktion auf der Schnittfläche der halbierten Samen ausgeführt. Über die Lokalisation des Strophanthins sind wir nur beim Samen unterrichtet. „Das Strophanthin ist im Zellinhalt des Endosperms und des Embryos enthalten“ (Hartwich)[1]. Die Reaktion tritt stets im gesamten Endosperm und in der Epidermis des Embryo ein. Diese Forderung stellt auch das deutsche Arzneibuch bei der offizinellen Strophanthus-Droge. Oft wird außerdem noch das subepidermale Gewebe und die Bündelregion grün. Zuweilen färbt sich der ganze Embryo intensiv. Strophanthus zeigt große individuelle Schwankungen im Strophanthingehalt. Interessant ist die Beobachtung Hartwichs[2]) über Samen, bei denen das eine Keimblatt eine starke Reaktion gibt, während das andere keine Spur von Strophanthin enthält. Jedenfalls rühren diese Samen von Pflanzen her, die aus der Bastardierung von strophanthinhaltigen und strophanthinfreien Eltern hervorgegangen sind (vegetative Bastardspaltung).

Vanillinglykosid.

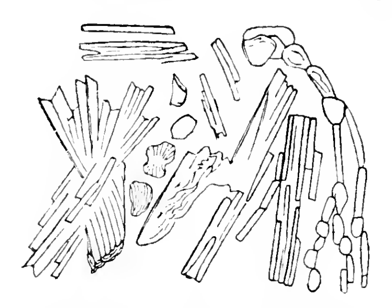
Vanillin (der Monomethyläther des Protocatechualdehyds) ist in den Pflanzen in den lebenden Zellen als Glykosid enthalten (Busse 1898).

---

[1]) C. Hartwich, Über den Strophanthussamen, Arch. d. Pharm., 1888, CCXXVI, S. 500.

[2]) C. Hartwich, Weitere Bemerkungen über Semen Strophanthi, Apoth.-Ztg., 1907, XXII, Nr. 94.

Beim Kochen des Saftes der Blätter von Vanilla mit verd. Schwefelsäure tritt Vanillingeruch auf (J. Behrens, 1899). In Avena sativa (Wurzel, Früchte) wird ein Vanillinglykosid angegeben (de Rawton, 1897). Die Spaltung bewirken Enzyme (Emulsin): sie erfolgt bei den Vanilleschoten durch Fermentation, kann künstlich durch Nekrobiose hervorgerufen werden (Kälte, Äther, Chloroform, Ed. Heckel, Compt. rend. 1910, CLI, S. 128). Vanillin wird ferner angegeben für Nigritella suaveolens (Blüten), Lupinus albus (Samen) und Ilex-Arten, sowie vor kurzem für die Orchidee Gymnadenia albida (v. Lippmann, Ber. chem. Ges., 1912, S. 3431): auch in Spargelsprossen, Kartoffelschalen, bei der Verarbeitung verkorkter und verholzter Membranen, in harzigen Sekreten (Asa foetida, Sumatra- und Siambenzoe, Peru- und Tolubalsam) ist Vanillin gefunden worden. — Physiologische Erfahrungen liegen nicht vor.


Fig. 96. Vanilla planifolia (Frucht). Vanillin im Sublimat (Tunmann).

Beim Nachweis des Vanillins in chemisch noch unerforschten Pflanzen wird man zweckmäßig den Geruch heranziehen. Man wird den Saft frischer Pflanzen oder die zerkleinerten getrockneten Pflanzen längere Zeit mit verd. Schwefelsäure kochen und auf einen ev. auftretenden oder sich kräftiger entwickelnden Geruch achten, dann die zerriebene Droge (in größerer Menge) der Mikrosublimation unterwerfen, das Sublimat auf Geruch prüfen und chemisch identifizieren und schließlich auf die Ermittlung der Lokalisation eingehen, wobei zu berücksichtigen ist, daß Vanillin in Äther und Alkohol sehr leicht, in heißem Wasser schwer und in kaltem Wasser sehr schwer löslich ist, und daß sich bei Drogen Vanillinkristalle im Gewebe vorfinden können und die Membran mit Vanillin imprägniert sein kann.

Makrochemisch stehen zum Nachweis einige Reaktionen zur Hand, die freilich nicht dem Vanillin allein zukommen. Vanillin gibt mit Phloroglucin, Resorcin, Thymol, Orcin u. a. bei Zusatz von Salz- oder Schwefelsäure rötliche Farbenreaktionen, sowie mit Anilinsulfat und mit Metadiamidobenzol gelbe Farbenreaktionen und wird mit Eisenchlorid blau. Molisch (Histochemie, 1891, S. 47), der diese Reaktionen ausprobte, kam zu dem Ergebnis, daß sich zum mikrochemischen Nachweis am besten Orcin sowie Phloroglucin in Verbindung mit konz. Schwefelsäure eignen, und alle späteren Forscher haben sich dieser Reaktionen bedient. Die zu prüfenden Präparate werden mit einer 4 %igen alkoholischen Lösung von Phloroglucin oder Orcin benetzt,

dann wird ein Tropfen konz. Schwefelsäure aufgetropft. Bei Gegenwart von Vanillin färbt sich der Schnitt sofort (ohne Erwärmung) und zwar bei Benutzung von Orcin karminrot, bei Anwendung von Phloroglucin ziegelrot. Die Orcinfärbung ist schärfer. Da die Schwefelsäure die Gewebe schnell zerstört, kann man auch Salzsäure mit gleichem Erfolge anwenden. Brauchbar ist ferner Einlegen von Schnitten in Millons Reagens (kalt). Die Vanillinzellen werden tief violett. Die Färbung ist ganz anders wie die rote bis ziegelrote Färbung, die Eiweißstoffe hervorrufen, und kann nur eine Verwechslung mit Enzymen verursachen.

Nestler[1]) hat die Sublimation eingeführt (S. 24). Einige sehr kleine Fragmente der Vanillefrucht genügen zur Sublimation: in $^1/_4$ Stunde ist bei sehr kleiner Flamme ein deutlicher Beschlag kleiner Tröpfchen vorhanden, nach 1 Stunde (nach dem Entfernen des Objektes von der Flamme) erfolgt Kristallbildung. Relativ selten wird man gut entwickelte, einzeln liegende Prismen antreffen. Überwiegend findet man lamellenartige Kristallmassen und Klumpen und Schollen von zum Teil fasriger Struktur (Fig. 96). Sämtliche Ausscheidungen, auch die eingetrockneten „Tröpfchen", leuchten im polarisierten Lichte in allen Farben lebhaft auf, die Auslöschung ist schief. Die Sublimate geben Vanillinreaktionen.

Als Versuchsobjekt wird die Vanillefrucht in Betracht kommen, in der Vanillin (1—3 %) nur im Parenchym vorkommt, bei der Fermentation auch von der Membran gespeichert wird. Das Sekret der Papillen ist vanillinfrei. — Bei harzigen Sekreten wird man die Sublimation heranziehen.

Glykosid von Mimosa pudica.

In Mimosa pudica, und zwar in den reizleitenden Geweben, kommt nach Haberlandt[2]) möglicherweise ein Glykosid vor, über welches jedoch noch nähere makrochemische Angaben fehlen. Schneidet man Stengel oder Blattstiel an, dann tritt eine Flüssigkeit aus, die zu einem kristallinischen Rückstand eintrocknet. Da die Kristalle Fehlingsche Lösung erst beim Erhitzen mit verd. Schwefelsäure reduzieren, so scheinen sie einem Glykoside anzugehören. Die Kristalle (Prismen, Drusen, Sphärite oder dendritische Gebilde) lösen sich in Eisenchlorid rotviolett, in konz. Schwefelsäure gelbgrünlich, beim Erwärmen rotbraun; sie lösen sich ferner leicht in Wasser, schwer in Alkohol, fast gar nicht in Äther. In der wässerigen Lösung bewirken verd. Schwefelsäure oder Salzsäure weiße körnige in Alkohol lösliche Niederschläge, Eisenvitriol eine rostbraune Färbung, Bleiazetat einen voluminösen gelblichen Niederschlag, der sich in Essigsäure löst.

[1]) A. Nestler, Der direkte Nachweis d. Cumarins u. Theins durch Sublimation, Ber. deutsch. bot. Ges., 1901, XIX, S. 361.

[2]) G. Haberlandt, Das reizleitende Gewebesystem der Sinnpflanze, Leipzig. 1890, S. 17.

Einige im Zellsaft gelöste Farbstoffe und wenig erforschte Körper.

Alkannin.

Der Alkannafarbstoff, das Alkannin, kommt vor in Wurzeln von Anchusa tinctoria (5—6%)[1], Lithospermum erythrorhizon, Macrotomia cephalotes, Arnebia- und Onosma-Arten u. a. Bei Anchusa tinctoria tritt er schon in der Keimwurzel in den Wurzelhaaren und einzelnen Epidermiszellen auf. Tschirch[2]) sagt: „In Interzellularräume wird das Alkannin sezerniert". Nach Vogl[3]) bildet es sich im Zellinhalte der äußeren Rindenschichten; die Zellen sterben dann ab und verkorken. „Die Bildung des Farbstoffes schreitet nicht nur bis in die Innenrinde fort, sondern dringt auch, den Markstrahlen des Holzkörpers folgend, bis in das Mark und ist die Ursache der eigentümlichen Zerklüftung der Wurzel". Nach Eriksson[4]) ist gerade umgekehrt die Zerklüftung die Ursache der Farbstoffbildung. Der Farbstoff fungiert hier, wie auch anderwärts (S. 220), als Wundschutz. Das Alkannin ist in Wasser unlöslich, löst sich in Alkohol, Äther, fetten und ätherischen Ölen mit roter, in stark verdünnten Alkalien mit grünlicher, in konzentrierten Alkalien mit blauvioletter Farbe. Den durch Alkalien grün werdenden Anteil nennt Gawalowski[5]) Anchusasäure, den blau werdenden Alkannasäure. Zur Bestimmung der Lokalisation entfernt Eriksson zunächst Harze und Fette „durch kalte Verseifung mit Alkali und darauffolgendes Auswaschen mit Wasser". Der reine Farbstoff bleibt blau fixiert im Zellinhalt und tritt nach Behandlung mit Salzsäure rot gefärbt hervor.

Bei der Mikrosublimation erhält man tiefrote Tropfen, die mit Alkali blau, bei nachfolgendem Säurezusatz rot werden. Dieses aus der Wurzel auf einfachste Weise gewonnene reine „Alkannin" kann zur Herstellung der Farbstofflösungen (S. 235) dienen. Nach einiger Zeit schießen aus den Tropfen lange Spieße hervor. Dadurch erfährt der Befund Tschirchs eine Erklärung, der bis 170 μ lange Alkanninnadeln in den Interzellularen der Alkannarinde angetroffen hat (Anat. S. 121). Tropfen und Nadeln sind nicht einheitlicher Natur. Anilin löst sofort den Farbstoff, eine farblose Grundsubstanz tritt hervor, die sich erst nach einiger Zeit löst.

[1]) C. J. Thompson, Pharm. Journ. Trans., 1886, S. 860.

[2]) A. Tschirch, Angew. Pflanzenanat., 1889, S. 65.

[3]) A. Vogl, Kommentar z. öst. Pharm., Wien 1892, S. 377.

[4]) E. Eriksson, Über die Alkannawurzel und die Entstehung ihres Farbstoffes, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1910, XX, S. 202.

[5]) A. Gawalowski, Ztschr. d. allg. öst. Apoth. Ver., 1902, XLVI, S. 1002.

Andromedotoxin.

Andromedotoxin, von Plugge (Arch. d. Ph., 1883) in Andromeda-Arten aufgefunden, wahrscheinlich identisch mit dem Asebotoxin Eijkmans, ist ein noch wenig erforschter stickstofffreier Körper; er ist löslich in Alkohol, Chloroform, verd. Alkalien, wird mit Schwefelsäure rotbraun, mit Salzsäure grünblau, violett, mit Salpetersäure gelb, mit Froehdes Reagens dunkelblau, mit Phosphorsäure rotviolett. Der Körper ist stark giftig und bildet eine amorphe weiße Masse.

Der mikrochemische Nachweis[1]) ist durch die Gegenwart von Gerbstoff und Quercetin sehr erschwert. Da das Andromedotoxin nur sehr mangelhaft erforscht ist, so können zum Nachweis nur folgende Reaktionen dienen: Durch Wässern werden aus den Schnitten Gerbstoffe und Glykosen möglichst entfernt. Die gewässerten und dann getrockneten Präparate werden 1—2 Tage den Dämpfen von Salzsäure ausgesetzt (feuerrote Klumpen). Wird auf die vorbehandelten Schnitte etwas Phosphorsäureanhydrid gebracht und schwach erwärmt, so bilden sich violettrote Ballen in den Zellen. Die mit konz. Salzsäure eintretende grünblaue Färbung ist wenig beweisend. Andromedotoxin findet sich im Blatte (Schwamm- und Nervenparenchym, Spuren in Epidermis, nicht in den Palisaden), weniger im Stengel (primäres Rindenparenchym, Spuren in den Markstrahlen), am reichlichsten in den basalen Teilen der Blüte (Karpellblätter, Samenknospen). Es tritt nicht nur in Andromeda-Arten, sondern auch in Azalea-, Kalmia- und Rhododendron-Arten auf, sowie nach mikrochemischen Befunden in Menziesia, Bruckenthalia und Pernettya.

Azafranin.

Azafranin (Altamirano), der Farbstoff von Escobedia scabrifolia und linearis, ist von C. Liebermann (Ber. chem. Ges., 1911, XLIV, S. 850) aus dem Benzolauszug in orangeroten Nädelchen erhalten worden (stickstofffrei). Der Farbstoff ist im gesamten Rindenparenchym, im Zellsaft gelöst, lokalisiert. In der Droge bildet er formlose, rotorangefarbene Massen. Azafranin kann in der Mikrochemie den Alkannafarbstoff vertreten.

Die Azafranin führenden Massen sind nach Lendner[2]) unlöslich in Wasser, Glyzerin, Paraffinöl, sehr wenig löslich in Xylol: sie lösen sich leicht in Alkohol, Chloroform, Eisessig, Äther, sowie langsam in kaltem, schnell in heißem Olivenöl. Konz. Schwefelsäure färbt blau, dann graublau oder violett. Salpetersäure blau, dann vorübergehend

[1]) O. Tunmann, Über den Nachweis und die Lokalisation des Andromedotoxins in Ericaceen, Apoth.-Ztg., 1911, XXVI, S. 555.

[2]) A. Lendner, Une racine tinctoriale, l'Escobedia scabrifolia R. et P., Schw. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1912, L, Nr. 18.

grün, schließlich gelb, Salzsäure sofort gelb. Aus der Farbstofflösung wird durch Bleiazetat, Sublimat oder Chlorzink ein gelber Niederschlag gefällt. Oxydationsmittel (Chromsäure, Kaliumpermanganat u. a.) entfärben die Lösungen. Schnitte werden durch Azafranin in gleicher Weise wie durch Alkannin gefärbt, spektroskopisch zeigen aber beide Farbstoffe ein verschiedenes Verhalten.

Betulin.

Betulin (Betulakampfer), aus der mit Wasser extrahierten Rinde von Betula alba durch Behandeln mit heißem Alkohol gewonnen, bildet farb- und geruchlose Nadeln, die beim Erhitzen nach Leder riechende Dämpfe entwickeln. Betulin kommt nicht nur in den weißen Schichten der Birkenrinde (12—14,1 %) vor, sondern auch in großer Menge in den tiefer liegenden rötlichweißen Partien der Rinde (11,9—13,1 %). In den braunen bis schwarzen Lamellen findet es sich in geringerer Menge (bis 1,4 %, Tunmann)[1].

Der Nachweis gelingt leicht durch Mikrosublimation; derart kann man Betulin in annähernd quantitativer Ausbeute gewinnen (s. oben). Bereits Präparate von 5—10 mg geben starke kristallinische Sublimate. Bei Anwendung von 0,01 g Material ist das Sublimat mit bloßem Auge deutlich zu erkennen. Man sublimiert gleich bei größerer Flamme (bei über 100°). Kurze Zeit nach dem Abkühlen läßt sich leicht erkennen, ob sämtliches Betulin aus den Präparaten heraussublimiert ist. An

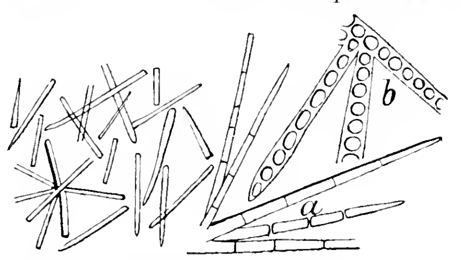


Fig. 97. Betulinkristalle aus dem Sublimat von Betula alba (Kork), bei *a* größere Kristalle, die in einzelne Teile zerbrechen, bei *b* Kristalle bei Einwirkung von Schwefelsäure (Tunmann).

denjenigen Präparaten, die noch Betulin enthalten, scheidet sich dieses auf der Oberfläche als feiner, weißer, federartiger Belag ab (wie der Vanillinbelag an Vanilleschoten). Die bei der Mikrosublimation zunächst entstehenden Kristalle sind feine Prismen, welche anfangs einzeln liegen, sich aber bald zu Gruppen (Sternen, Drusen, baum- und strauchartigen Gebilden) vereinigen und schließlich untereinander verflechten. Dann bilden sich längere Nadeln, die bisweilen schwach gebogen sind, und zuletzt entstehen derbe Spieße mit schwach zugespitzten Enden (Fig. 97). Die langen Kristalle brechen nach einiger Zeit quer durch. Bei gleich gerichteten Nadeln geht der Bruch über mehrere Nadeln

[1]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie des Betulakampfers, Apoth.-Ztg., 1910, XXVI, S. 344.

in gerader Richtung hinweg. Die Bruchlinien laufen parallel. An diesen Stellen fallen die Kristalle auseinander und stellen dann kurze derbe Säulen dar. Die Kristalle lösen sich unter Deckglas leicht in Anilin, schwerer in wässeriger Chloralhydratlösung, Eisessig und heißem Benzol. In Wasser, Alkohol, Petroläther, Schwefelkohlenstoff, Chloroform, Äther sind sie unter Deckglas selbst beim Erwärmen nur zum Teil in Lösung zu bringen. Vanillinsalzsäure und Salpetersäure lösen gleichfalls nur zum Teil und bilden ölige schmierige Massen. Konz. Schwefelsäure erzeugt unter Gelbfärbnng an den größeren Kristallen eine recht charakteristische Vakuolenbildung, die lange Zeit bestehen bleibt (Fig. 97).

Im Gewebe findet sich Betulin im Inhalt der Korkzellen als amorphe eingetrocknete Klumpen oder als kleinkörnige, krümelige Massen, die mit Schwefelsäure schwache Gelbfärbung geben.

Mit Hilfe des von Tunmann angegebenen Nachweises durch Mikrosublimation konnte Kobert[1]) ein altes, sehr wertvolles Rindenpapier als Birkenrinde identifizieren. Das Betulin hat sich über 1000 Jahre unverändert erhalten.

Columbin.

Columbin (Lakton der Columbasäure[2]), Wittstock, 1830) bildet bitter schmeckende, durchscheinende, farblose Säulen und Nadeln, die sich in Wasser, Alkohol, Äther schwer lösen. Der Bitterstoff kommt in Wurzeln der Menispermaceen vor (Jatrorrhiza palmata, 0,8% [Bödeker], Tinospora cordifolia 2,2% [C. Hartwich], T. Bakis 3%).

Nach Bödeker sollte sich Columbin in Jatrorrhiza palmata in kristallinischer Form in der Innenrinde der Wurzel finden, eine Angabe, die ich nicht bestätigen konnte. Rundquist ist dann auf den Nachweis eingegangen und hat die Schnitte mit Essigsäure behandelt und nachher in Schwefelsäure eingelegt. Rotfärbung soll Columbin in der Nähe des Kambiums anzeigen. Derart erhielt ich wiederholt nur eine rotbraune Färbung, die nach einiger Zeit verging. Die Färbung war allerdings am stärksten am Kambium; sie trat aber außerdem im gesamten Parenchym auf, am schwächsten in der Außenrinde. Fast ausschließlich waren die Zellwände gefärbt, was jedenfalls mit der Methode zusammenhängt. Die verholzten Membranen (Sklereiden, Gefäße) wurden bei der Reaktion tief grün (s. S. 294).

[1]) R. Kobert, Über das älteste in Deutschland befindliche echte Papier, Der Papierfabrikant, Festheft, 1911.

[2]) Columbasäure sollte sich in Jatrorrhiza nach Rundquist mit Ammoniakdämpfen nachweisen lassen (Braunfärbung), doch stellen sämtliche Chemiker (Feist, Frey u. a.) die Existenz dieses Körpers in Abrede.

Embeliasäure.

Embeliasäure (Scott, Warden, 1888, Heffter, Feuerstein. Arch. d. Pharm., 1900) soll ein Oxychinonderivat sein und kommt im Samen von Embelia ribes Burm. vor. In getrocknetem Material ist Embeliasäure ausschließlich in den bis zur Mitte der Samen reichenden Ruminationszapfen in Gestalt gelblicher Klumpen enthalten, die aus gelblichen Kristallblättchen bestehen. Die Kristalle lösen sich in Äther mit gelber, in verdünnter Kalilauge mit rotvioletter Farbe. Bei Zusatz von überschüssiger Kalilauge scheiden sich aus der violetten Lösung große rotviolette Nadeln aus, die sternförmige Gruppen bilden. Die feinen Nadeln sind bisweilen gebogen (Wéber)[1]. — Die Sublimation muß versucht werden: sie wird Erfolg haben.

Gelseminsäure.

Gelseminsäure (β-Methylaesculetin) bildet blaßgelbe Nadeln und kommt in den Wurzeln und Ausläufern von Gelsemium sempervirens vor, sowie in verschiedenen Solaneen (Scopolia- und Atropa-Arten). Die Gelseminsäure, die den wässerigen und alkoholischen Auszügen der Pflanzen eine blaue Fluoreszenz verleiht, wurde in Gelsemium von Sonnenschein für Aesculin angesprochen.

Bei Gelsemium sempervirens läßt sich die Gelseminsäure durch Sublimation nachweisen (Tunmann, Ap.-Ztg., 1911), die zugleich das einfachste Verfahren ist, G. sempervirens von den ähnlich gebauten Achsen und Wurzeln von G. elegans zu unterscheiden. Ein kleiner Schnitt der Rinde genügt zur Reaktion. Die Kristalle, besonders in den ersten Sublimaten, sind farblos (bei durchfallendem Lichte), entstehen bereits während der Sublimation und polarisieren lebhaft in allen Farben (gelb, rot, grün). Einige Kristalle sind nadelförmig und löschen schief aus, die meisten sind flach säulenförmig mit geraden Enden (nicht zugespitzt) und löschen parallel zur Längskante aus (letztere können bis 100 μ lang werden) (Fig. 98). Die Kristalle sind unter Deckglas in kaltem Wasser und Azeton unlöslich, sie lösen sich leicht in Alkalien (gelb), zum Teil (bei mehrmaligem Durchsaugen) in Alkohol. In heißem Wasser sind sie ebenfalls löslich. Die wässerige

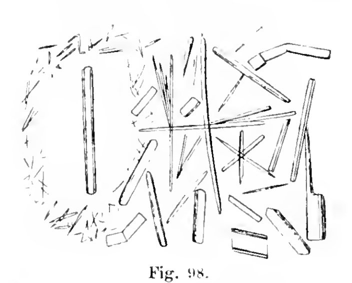


Fig. 98. Mikrosublimat von Gelsemium sempervirens (Wurzel, Rhizome, Stengel), meist Gelseminsäure (Tunmann).

[1]) D. Wéber, Beitr. z. Anat. pharmakognostisch wichtiger Samen und Früchte, Berner Dissertation, 1907, S. 61.

Lösung zeigt eine tief blaugrüne Fluoreszenz, die selbst beim geringsten Sublimat beim abwechselnden Halten des Objektträgers über weiße und schwarze Unterlagen sichtbar ist, bei Zusatz von Salzsäure verschwindet, um bei Zusatz von Kalilauge wieder einzutreten. Die Reaktion mit Salpetersäure-Ammoniak, die bei ganz schwachen Sublimaten (von 0,001 g Droge) eintritt, ist wie folgt durchzuführen: Das Sublimat wird mit dem Deckglase bedeckt, auf einer Seite wird etwas Ammoniak zugesetzt, so daß die vordringende ammoniakalische Lösung nicht ganz den anderen Rand des Deckglases erreicht. Dort setzt man einen kleinen Tropfen Salpetersäure zu. Sowohl die ammoniakalische, blau fluoreszierende Lösung als auch die Lösung der Säure haben gelbe Ränder. Verschiebt man nun das Deckglas, so daß beide Tropfen sich berühren, dann entsteht sofort an der Berührungsstelle eine tief blutrote Zone. Bei G. sempervirens ist Gelseminsäure in den Wurzeln, Rhizomen und Ausläufern nachweisbar und zwar in Holz und Rinde. Wurzelfasern von 0,5 mm Durchmesser geben die Reaktion bereits.

Läßt man die Sublimate längere Zeit liegen, dann werden die großen Nadeln hellgelb; außerdem bleiben weiße Kristalle bestehen. Die Sublimate sind oft nicht einheitlicher Natur. Zuweilen entstehen Kristalle, die sich im Gegensatz zur Gelseminsäure in Äther selbst unter Deckglas lösen und wahrscheinlich abgespaltenes Aesculetin darstellen. In den letzten Sublimaten sind Fette zugegen, die in der Kalilösung als glänzende Tropfen erscheinen und Spuren von Alkaloid führen.

Gentisin.

Gentisin (Gentianin, Gentianasäure, Monomethylester eines Trioxyxanthons) wird aus dem zuvor mit Wasser (zur Entfernung des Gentiopikrins) erschöpften Enzianpulver durch Extraktion mit Alkohol gewonnen und bildet ein gelbes Pulver, das aus bis 8 µ breiten gelben Prismen besteht. Es wurde schon von Henry und Caventou (1821) im Rhizom von Gentiana lutea aufgefunden und wird von Kennedy (1876) und Lloyd (1880) auch für die Wurzel der amerikanischen Gentianee Frasera carolinensis Walter angegeben.

Der mikrochemische Nachweis ist mit Hilfe der Mikrosublimation zu erbringen[1]). Man erhält Gentisinsublimate bereits mit 0,05 g Enzianpulver, 0,8 g Enziantinktur und mit 0,06 g schweren Schnitten des getrockneten Rhizoms (Droge). Eine 3jährige Wurzel einer Kulturpflanze sowie eine lebende Blüte enthielten kein Gentisin. Die Gentisinkristalle sind im Sublimate nicht gleichmäßig verteilt, das Sublimationsfeld muß abgesucht werden. Anfangs entstehen kurze Prismen, ein

[1]) O. Tunmann, Beiträge z. angew. Pflanzenmikrochem., Gehe Ber., 1911, S. 160.

Teil dieser wächst zu langen farblosen Nadeln aus, die überwiegend gebogen sind und unter Deckglas sich weder in Wasser (selbst beim Erwärmen) noch in Alkohol, in Äther, Essigsäure und Xylol lösen. Sie lösen sich in wässeriger Chloralhydratlösung und augenblicklich in Anilin (Fig. 99).



Fig. 99. Gentisinkristalle im Sublimat von Gentiana lutea (Wurzel) (Tunmann).

Der Gentisinnachweis kann zur Diagnose des Enzianpulvers dienen. Ist Enzianpulver mit dem Rhizom von Rumex alpinus verfälscht, dann sind im Sublimat neben fast farblosen Gentisinprismen auch Anthrachinonderivate (Klumpen und spitze tiefgelbe Nadeln) zugegen. Alkohol läßt Gentisin ungelöst, während die Anthrachinonderivate sofort dunkelgelb gelöst werden (Tunmann, 1911).

Helichrysin.

An dieser Stelle sei das Helichrysin, der gelbe Blütenfarbstoff der Helichrysum-Arten, eingefügt, dem Rosoll[1]) chinonartige Natur zuschreibt. Es ist aber ganz ungewiß, ob ein Chinonderivat vorliegt, ob es sich vom Anthracen oder vom Naphthalin ableitet; in glykosidischer Bindung wird es wohl nicht vorliegen. Nach Rosoll soll Helichrysin an das Plasma (?) gebunden sein; es ist in Wasser, Äther, organischen Säuren (Essigsäure, Weinsäure, Oxalsäure) löslich, in Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Benzol unlöslich. Schwefelsäure und Alkalien geben eine purpurrote Farbenreaktion. Getrocknete Blüten werden in mit Salzsäure versetzter Boraxlösung getaucht. Die Blättchen des Hüllkelches werden rubinrot. — Die Mikrosublimation müßte Aufklärung bringen; ebenso bei den übrigen chinonartigen Körpern, bei Perezon (Perezia-Wurzel), Tectochinon (Tectona, Holz) und Rhinacanthin (Rhinacanthus-Wurzel).

Luteofilin.

Luteofilin nennt Molisch[2]) einen in den Schleimsäften verschiedener Amaryllideen, Liliaceen, Gramineen, Commelinaceen, Lobeliaceen auftretenden Körper, dessen Chemismus noch nicht näher erforscht ist. Beim Eintrocknen der isolierten Schleimtröpfchen (Clivia nobilis) scheidet sich Luteofilin in Sphärokristallen aus, die zwar wasser-

[1]) A. Rosoll, Sitzber. Wiener Akad., 1884, LXXXIX, S. 137.

[2]) H. Molisch, Studien über den Milchsaft und Schleimsaft der Pflanzen, Jena 1901.

löslich, aber unlöslich in Alkohol, Äther u. a. sind. Durch 20% wässerige Kalilauge werden die Kristalle in verschiedene Kristallformen übergeführt (körnige Bildungen, haarartiger Filz), die im durchfallenden Lichte gelb, im auffallenden blau erscheinen.

Lipochrome.

Als Lipochrome faßt man gelbe bis rote Farbstoffe zusammen, die in der Zelle gemeinschaftlich mit Fetten auftreten und sich durch einige gemeinsame Reaktionen auszeichnen. Bei näherer Erforschung sind viele Lipochrome als Carotine erkannt worden, die Konstitution anderer läßt einen komplizierten Aufbau vermuten, so die des Bixins. Doch auch beim Bixin scheinen Beziehungen zu den Xanthocarotinen in der Art zu bestehen, daß durch Schwefelsäure Additionsprodukte mit analog konstituiertem Chromophor gebildet werden (van Hasselt, 1910). Jedenfalls ist die Gruppe der Lipochrome nur ein Notbehelf.

Mit der Mikrochemie der Lipochrome, die durch Schwefelsäure und Salpetersäure blau, durch Jodjodkalium grün gefärbt werden, hat sich Zopf[1]) beschäftigt. Der bei Einwirkung von Schwefelsäure entstehende blaue Körper läßt sich zur Kristallisation bringen (Lipocyankristalle). Der Farbstoff wird zunächst gereinigt, indem man den alkoholischen Auszug mit 30% Natronlauge einige Zeit bis zum Kochen erhitzt. Das Fett wird dadurch verseift, der frei gemachte Farbstoff wird von Petroläther aufgenommen. Einige Tropfen des Petroläther-Auszuges werden auf dem Objektträger verdunstet, das Deckglas aufgelegt und eine möglichst geringe Quantität Schwefelsäure zugesetzt. Es entstehen „Schüppchen, Splitter oder eckige Körner", die sich übrigens nur einige Stunden halten. Direkt aus den Präparaten soll man Kristalle erhalten können, wenn man den Schnitt austrocknen läßt und dann mit wenig konz. Schwefelsäure versetzt. Bei Blütenblättern wird die Reaktion sehr durch Zufälligkeit beeinflußt.

Bei der mikrochemischen Bestimmung eines gelbroten Fettfarbstoffes werden in erster Linie die beim Nachweis der Xanthocarotine (s. d.) angeführten Methoden auszuführen sein: vorzüglich wird die Kalimethode, bei der die anwesenden Fette gleichzeitig verseift werden, Aufklärung bringen.

Scutellarin.

Scutellarin wurde von Molisch entdeckt, von Goldschmiedt[2]) aus Scutellaria altissima (Blätter und Blüten, Ausbeute 0,62—0,97%) isoliert und näher studiert.

[1]) W. Zopf, Über das mikrochemische Verhalten von Fettfarbstoffen und fettfarbstoffhaltigen Organen, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1889, XI, S. 172.

[2]) H. Molisch und G. Goldschmiedt, Über das Scutellarin, einen neuen Körper bei Scutellaria und anderen Labiaten, Sitzber. Wien. Akad., 1901, CX, 1. Abt., S. 185.

Es bildet strohgelbe Nadeln, die sich in Wasser und Alkohol lösen. Der Körper gehört zu den Flavonen. Bei der Hydrolyse mit 30% Schwefelsäure wird Scutellarein abgespalten. Scutellarin kommt in allen Scutellaria-Arten vor, sowie in Galeopsis tetrahit, Teucrium chamaedrys u. a.

Zum mikrochemischen Nachweis setzt man frische Blätter auf 1 Stunde in verschlossenem Behälter den Dämpfen von konz. Salzsäure aus und legt dann größere Stückchen behufs Aufhellung in Chloralhydrat (einige Stunden) ein. In der Epidermis sind nun Sphärite (konzentrisch geschichtet mit radialer Streifung, bis 100 μ groß) von Scutellarin. Für Dauerpräparate werden die Objekte rasch mit Wasser abgespült, 1/2 Stunde in Glyzerin-Wasser (gleiche Teile) eingelegt und in Glyzerin eingebettet. Man kann ferner Schnitte in 10% Salzsäure legen; es entstehen teils Sphärite, teils büschel- und sternartig gruppierte Nadeln. Die Kristalle lösen sich in Ammoniak, Soda, Kalilauge, werden auf Zusatz einer Spur Ammoniak, Kalilauge, Natronlauge, Soda, Kalkwasser, Äthylamin und Trimethylamin tiefgelb. Der Schnitt mit dem auskristallisierten Scutellarin wird mit Wasser abgespült und abgetrocknet. Das Scutellarin wird beim Betupfen mit Barytwasser rosenrot (an der Luft nach einiger Zeit dunkelgrün) und bei nachfolgendem Einlegen in Jodchloralhydrat malachitgrün (Fig. 100).

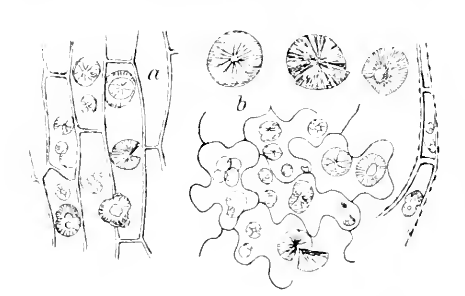


Fig. 100. Scutellaria altissima. Scutellarin-sphärite (mit Salzsäure), a) subepidermale Zellen des Stengels, b) obere Blattepidermis (Tunmann).

Spergulin.

Die chemische Natur des, von Harz[1]) angegebenen Spergulins ist ganz unaufgeklärt. Die stickstofffreie Substanz soll leicht in Alkohol und Methylalkohol löslich sein; sie soll sich aber nicht lösen in kaltem und heißem Wasser, verd. anorganischen Säuren, Schwefelkohlenstoff, Chloroform, fetten Ölen u. dergl. In kristallinischer Form ist der, fluoreszierende Lösungen gebende Körper noch nicht erhalten. Von konz. Schwefelsäure wird er mit dunkelblauer Farbe gelöst. Spergulin soll in den Samenschalen von Spergula maxima und Spergula vulgaris vorkommen.

Konz. Schwefelsäure färbt in den Präparaten die äußeren stark verdickten Zellwände der Samenschalen tiefblau. Spergulin soll demnach in den Membranen enthalten sein. — Die Sublimation müßte versucht werden.

[1]) C. O. Harz, Über die Entstehung und Eigenschaften des Spergulins, eines neuen Fluoreszenten, Bot. Ztg., 1877, XXXV, S. 489.

Eiweißkörper, Nukleoproteide, Plastin und Volutin.

Eiweißstoffe sind Körper hochzusammengesetzter Natur, die neben Stickstoff noch Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff, oft auch Schwefel führen, eine Anzahl Reaktionen gemeinsam haben, durch tierische Membranen nicht diffundieren (Kolloide) und beim Erhitzen koagulieren. Beim hydrolytischen Abbau liefern die Eiweißstoffe Aminosäuren, die sowohl der Fettsäurereihe (Glykokoll, Alanin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Arginin, Cystin u. a.), als auch der aromatischen (Phenylalanin, Tyrosin) und der heterocyklischen Reihe (Tryptophan, Histidin u. a.) angehören.

Die Eiweißstoffe lassen sich in einige Gruppen vereinigen: die nativen oder genuinen Eiweißstoffe (Proteine): hierher gehören die phosphorfreien Albumine und Globuline, die phosphorhaltigen Nukleoalbumine, Vitelline u. a. Die genuinen Proteine bilden außerdem mit anderen organischen Komplexen hoch zusammengesetzte Verbindungen, die Proteide (Glykoproteide, Nukleoproteide). Hierzu kommen noch die Spaltlinge (Albumosen, Peptone), die noch Eiweißcharakter besitzen. Eiweißstoffe beteiligen sich meist an dem Aufbau des Protoplasmas, in erster Linie am Aufbau des Zellkerns, der Chromoplasten, der Reservestoffe (Aleuronkörner)[1]. Doch soll nicht das Plasma jeder Zelle Eiweiß führen. Wie schon Sachs (Mikroch. Unters., 1862) angab und Reinke bestätigte, soll das Plasma ausgewachsener, gestreckter Parenchymzellen kein Eiweiß enthalten. Proteide kommen jedenfalls auch im Zellsaft vor. Eine direkte Wirkung des Lichtes bei der Eiweißbildung ist bisher nicht erwiesen (Zalewski, Ber. bot. Ges., 1909).

Ein Reagens, welches auf alle Eiweißkörper reagiert, besitzen wir naturgemäß nicht. Die gegenwärtig gebräuchlichen Reaktionen sind teils Fällungs-, teils Farbenreaktionen (die Koagulation sei einbegriffen). Zu den Fällungsreagentien zählen bekanntlich Alkohol (auch Chloroform, Äther, Benzol) und Azeton. Technisches Azeton fällt aus tierischen Eiweißlösungen (Milch, Blut) Eiweiß quantitativ (Th. Weil, Ber. chem. Ges., 1910, XLIII, S. 508) und gab mir bei Pflanzen ebenfalls gute Resultate.

Mit den Schwermetallen bilden die Eiweißkörper Salze: sie werden somit aus ihren sauren, neutralen und alkalischen Lösungen ausgefällt durch Eisenchlorid, Kupfersulfat und -azetat, Quecksilberchlorid (fällt auch Peptone) u. a. Ferner fällen starke Mineralsäuren und die Alkaloidreagentien. Die letzteren bewirken voluminöse Fällungen, die wohl durch die Aminosäuren bedingt werden.

Die Koagulation wurde von Bokorny[2]) zum Nachweis von Eiweiß benutzt. Am besten erfolgt diese, die nur bei schwach saurer

[1]) Über das angebliche Vorkommen von Eiweiß in den Zellmembranen s. d.

[2]) Th. Bokorny, Über den mikrochemischen Nachweis von Eiweiß, Chem. Ztg., 1911, XXXV, S. 69.

Reaktion möglich ist, durch Erwärmen. Die Höhe der Temperatur ist bei den einzelnen Eiweißkörpern verschieden. Durch Dialyse salzfrei gemachtes Eiweiß koaguliert nicht mehr durch Hitze. Doch tritt bei Zusatz von Chlornatrium zur erhitzten Lösung Koagulation ein. Bokorny hat aber sein Verfahren nur an „Proteosomen" (s. d.) und nur an 2 Objekten erprobt (Spirogyra und Echeveria), so daß ein eingehendes Studium dieser Reaktion noch aussteht. Hierbei wären die Erfahrungen von Spiro[1]) zu berücksichtigen, daß viele Körper die Hitzekoagulation der Eiweißstoffe hemmen und daß sich unter diesen gerade Substanzen finden, die häufig in den Zellen vorkommen (Cholin, Mannit, Zucker). Eine ausgedehnte Anwendung der Reaktion scheint somit mit Schwierigkeiten verbunden zu sein.

Wir wenden vorzugsweise Fällungsmittel an, welche gefärbte Reaktionsprodukte liefern, die im mikroskopischen Bilde schärfer hervortreten. Um Irrtümer auszuschließen, müssen die Schnitte vor Ausführung der im folgenden genannten Reaktionen in Wasser, dann in absolutem Alkohol aufgekocht werden. Außerdem erfahren die Objekte, da sehr viele Pflanzen Alkaloide führen, eine weitere Behandlung mit Weinsäure-Alkohol und mit Chloroform (zur Entfernung von Kautschuk und schwer löslichen Fetten). Allgemein gültige Regeln lassen sich für die Vorbehandlung nicht geben; es müssen tunlichst alle ähnlich reagierenden Substanzen entfernt werden, sofern sie zu Täuschungen Anlaß geben können. Gute Reaktionen auf Eiweiß geben: Jodjodkalium, Eosin, Millons Reagens, dann folgen Salpetersäure und Pikrinsäure; weitere Reagentien liefern brauchbare Hilfsreaktionen. Bei einiger Übung wird man bereits bei positivem Ausfall einiger Reaktionen an vorbehandelten Schnitten auf Eiweiß schließen können.

Jodjodkalium (1,0 Jod, 3,0 Jodkalium, 100,0 Wasser) liefert die besten Resultate. Andere ebenfalls mit Jodjodkalium reagierende Substanzen lassen sich relativ leicht entfernen. Unbedingt erforderlich ist nur die Entfernung von im Zellsaft gelösten Stoffen.

Zur Eosinreaktion wird eine sehr verd. wässerige Lösung benutzt. Die Schnitte gelangen nach erfolgter Färbung in Glyzerin. Nach 1- bis 2stündigem Verweilen in Glyzerin sind sie schön differenziert. Zuweilen ist die Stärke schwach gefärbt. Fette, Harze, Schleime, Gummi, Pektine bleiben ungefärbt. — Eiweißstoffe speichern begierig Anilinfarben (s. Kern). Aus Farbstoffgemischen eignen sich die genuinen Eiweißstoffe die sauren Farbstoffe an, während die Nukleoproteide (s. d.), resp. die in diesen enthaltenen Nukleine, die basischen Farbstoffe annehmen.

[1]) K. Spiro, Hofmeisters Beitr., 1903, IV, S. 300

Vielfach benutzt wird Millons Reagens[1]. Es reagiert aber nicht mit allen Eiweißsubstanzen, sondern nur mit jenen, die Tyrosin enthalten (Empfindlichkeitsgrenze 1 : 20000). Anderseits tritt das Reagens auch mit aromatischen Körpern in Reaktion, die entweder eine Hydroxyl- oder eine Methoxylgruppe oder beide Gruppen zugleich enthalten (Phenol rot. Resorcin, Hydrochinon, Pyrogallol bräunlich, Gallussäure rötlichbraun, ferner Vanillin, Eugenol u. a.). Nach Nickel[2]) wirkt das Reagens nicht nitrierend, sondern bildet unter dem Einfluß der salpetrigen Säure Nitrosokörper.

Millons Reagens wird bereitet durch Auflösen von 1 ccm Quecksilber in 9 ccm Salpetersäure (spez. Gew. 1,52), die Lösung wird mit dem gleichen Vol. Wasser verdünnt. Man kann auch nach Plugge[3]) 1 Gewichtsteil Quecksilber in 2 Gewichtsteilen Salpetersäure (spez. Gewicht 1,42) lösen und die Lösung mit dem doppelten Vol. Wasser verdünnen. Millons Reagens zersetzt sich selbst bei guter Aufbewahrung nach einiger Zeit und wird unbrauchbar. Das Reagens kann durch Zusatz einiger Tropfen wässeriger Kaliumnitritlösung wieder brauchbar gemacht werden (Krasser[4]). Durch die im Reagens befindliche Salpetersäure wird aus Kaliumnitrit salpetrige Säure in Freiheit gesetzt.

Zur Ausführung der Reaktion werden die Präparate direkt in das Millonsche Reagens eingetragen. Nach einiger Zeit nehmen tyrosinführende Eiweißsubstanzen eine mehr oder weniger ziegelrote bis rosenrote Farbe an. Feste Eiweißkörper gehen hierbei nicht in Lösung. Durch gelindes Erwärmen wird die Reaktion beschleunigt. Will man in Wasser liegende Präparate prüfen, dann setzt man, um lästige Ausscheidungen zu verhindern, vor dem Zusatz des Millonschen Reagens einen Tropfen verd. Salpetersäure (1 : 50) zu.

Zeigt die Millonsche Reaktion die tyrosinführenden Eiweißkörper an, so kann man mit Hilfe der Chinonreaktion von Raciborski[5]) in geeigneten Fällen (Asparagus) die Aminosäuren der Fettsäurereihe (Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Arginin) nachweisen. Die Schnitte werden

[1]) E. Millon, Compt. rend., 1849, XXVIII, S. 40.

[2]) E. Nickel, Die Farbenreaktionen der Kohlenstoffverbindungen, Dissertation, Jena, 1888.

[3]) P. C. Plugge, Salpetrige Säure haltiges Quecksilbernitrat als Reagens auf aromatische Körper mit einer Gruppe OH am Benzolkern, Arch. d. Pharm., 1890, CCXXVIII, S. 9.

[4]) Fr. Krasser, Unters. über d. Vorkommen von Eiweiß in der pflanzlichen Zellhaut, nebst Bemerkungen über den mikrochem. Nachw. d. Eiweißkörper, Sitzb. Wiener Akad., 1886, XCIV, 1, S. 118.

[5]) M. Raciborski, Beiträge zur botanischen Mikrochemie, Bull. de l'Ac. de Cracovie, 1906, S. 553.

direkt auf dem Objektträger in eine konz. wässerige Chinonlösung gelegt: es tritt sofort oder nach einigen Minuten, ev. erst nach Erwärmen, Rotfärbung ein. Die Reaktion verlangt eine kritische Beurteilung; Phenole und Phenolderivate, also Gerbstoffe und Phloroglucinderivate geben ebenfalls Rotfärbung, so daß man sich von dem Vorhandensein dieser Substanzen erst überzeugen muß, zudem soll die Reaktion bei Gegenwart von aromatischen Aminosäuren nicht auftreten. Auf diese Verhältnisse weist schon Raciborski hin. Nun müssen wir aber berücksichtigen, daß nach Schaer[1]) auch zahlreiche freie und in Chloralhydrat gelöste Alkaloide (Brucin, Morphin, Kodein, Strychnin, Veratrin, Koniin, Kokain, Atropin, Chinin) bei Chinonzusatz kirschrot werden, und daß die gleiche Färbung durch „zahlreiche alkalische Substanzen (namentlich alkalische Salze)" bewirkt wird.

Zu den zuverlässigsten Eiweißreaktionen zählt die Xanthoprotein-Reaktion mit Salpetersäure (Empfindlichkeitsgrenze 1 : 21000)[2]). Die Reaktion wird unter Deckglas vorgenommen. Auf Zusatz von konz. Salpetersäure werden Eiweißsubstanzen, die den Tyrosinkomplex führen, nach einiger Zeit tiefgelb (Xanthoproteinsäure). Erwärmen beschleunigt die Reaktion, ist aber nicht empfehlenswert. Saugt man einen Teil der Säure ab und fügt Ammoniak im Überschuß zu, dann nimmt die Färbung einen dunkleren Ton an und wird dunkelgelb, fast braun (Ammoniumxanthoprotein). de Wèvre[3]) nimmt eine etwas verdünnte Säure (3 Teile Säure + 1 Teil Wasser). Nickel fand, daß Harze, Alkaloide und einige oxyaromatische Verbindungen die gleiche Reaktion geben. Eine Verwechslung ist aber, selbst wenn diese Körper zuvor aus den Präparaten nicht entfernt sein sollten, ziemlich ausgeschlossen, denn den scharfen Übergang der gelben Farbe in Braungelb bei Ammoniakzusatz zeigen nur die Eiweißstoffe. Die Xanthoprotein-Reaktion ist für die Praxis brauchbarer als die Millonsche Reaktion; sie beruht auf Bildung von Nitroderivaten.

Pikrinsäure in konz. wässeriger Lösung wirkt ebenfalls gut. Die vorbehandelten (alkaloidfreien) Schnitte verbleiben mehrere Stunden bis einen Tag in der Lösung und werden in Wasser oder Glyzerin untersucht.

Bei der Reaktion mit Phosphormolybdänsäure wird Eiweiß körnig gefällt und gelb gefärbt. Die Präparate kommen in eine Lösung von phosphor-

[1]) Ed. Schaer, Über das Verhalten der Alkaloide zu Chinon, Apoth. Ztg., 1911, XXVI, S. 831.

[2]) O. v. Fürth, Habilitationsschrift, Straßburg, 1899.

[3]) A. de Wèvre, Recherches sur la technique microchimique des albuminoides, Bull. d. l. Soc. Belge de Microsc., 1894, XX, S. 91.

molybdänsaurem Natron in Salpetersäure (1 g phosphormolybdänsaures Natron in 90 g Wasser gelöst und mit 5 g konz. Salpetersäure versetzt; nach 1 Woche wird abfiltriert). Die Bildung des Niederschlages läßt sich im mikroskopischen Bilde verfolgen. Nach einiger Zeit werden die Schnitte blau. Die Reaktion ist als Hilfsreaktion brauchbar, besonders bei lebendem Material; sie ist sehr scharf und zeigt makrochemisch noch wenige µg an (Empfindlichkeitsgrenze 1 : 200000).

Die Berlinerblau-Reaktion hat Zacharias[1]) benutzt. Die Pflanzenteile werden zunächst eine Stunde lang mazeriert in einer frisch bereiteten Lösung von gelbem Blutlaugensalz (1 Teil 10% wässerige Lösung von Ferrocyankalium, 1 Teil Wasser und 1 Teil Essigsäure vom spez. Gew. 1,063). Alsdann werden die Objekte so lange mit stets zu erneuerndem 60% Alkohol ausgewaschen, als dieser noch sauer reagiert. Zusatz von verd. Eisenchloridlösung führt das vom Eiweiß gespeicherte gelbe Blutlaugensalz in Berliner Blau über (Empfindlichkeitsgrenze 1 : 90000). Die Färbung hält sich längere Zeit in Glyzerin. In gleicher Weise reagieren verschiedene Membranen (Rizinussamen).

Auch Loew und Bokorny[2]) färbten Cytoplasma-Eiweiß der Spirogyren in ähnlicher Weise. Sie ließen die Spirogyren etwa eine Stunde in 0,1% Ammoniaklösung und brachten sie dann auf 12 Stunden in eine 10% wässerige Lösung von gelbem Blutlaugensalz, der 5% Essigsäure zugesetzt war. Nach Auswaschen mit Wasser kamen die Algen auf 12 Stunden in verd. Eisenchloridlösung.

Die Reaktion von Guezda mit ammoniakalischer Nickelsulfatlösung[3]) tritt gegen die erst angeführten Reaktionen an Brauchbarkeit zurück, schon weil die Eiweißstoffe hierbei teils gelb, teils blau werden. Letztere Farbe geht bei Zusatz von Kalilauge in Orangegelb über. Man mazeriert die Schnitte einige Stunden in einer konz. Lösung von Nickelsulfat, die mit Ammoniak gesättigt ist. Erwärmen beschleunigt und verschärft die Reaktion, die übrigens auch mit Gerbstoffen (Tannin, Catechu) erhalten wird. Die Färbung hält sich einige Zeit in Glyzerin.

Die Biuretreaktion, die rot- bis blauviolette Färbung gewisser Eiweißkörper mit Kupfersulfat in alkalischer Lösung, wurde schon von F. Rose und Mitscherlich[4]) beobachtet und von Sachs[5]) mikro-

[1]) E. Zacharias, Üb. Eiweiß, Nuklein u. Plastin, Bot. Ztg., 1883, XL, S. 209.

[2]) O. Loew u. Th. Bokorny, Über d. Verhalt. d. Pflanzenzellen zu stark verd. alkalischer Silberlösung, Botan. Centralbl., 1889, XXXIX, S. 369.

[3]) Auf unserem Gebiete eingeführt von Spencer Le Moore, Das angebliche Vorkommen von Eiweiß in den Wandungen der vegetabilischen Zellen, Chem. Centralbl., 1892, II, Nr. 17.

[4]) F. Rose, Pogg. Ann. 1833, XXVIII, S. 132, C. G. Mitscherlich, Pogg. Ann., 1837, XL, S. 106.

[5]) J. Sachs, Über einige neue mikroskopische Reaktionsmethoden, Sitzb. Münch. Ak., 1859, XXXVI, S. 5.

chemisch verfolgt. Sie kommt nach Schiff[1]) jenen Eiweißkörpern zu, die ähnlich dem Biuret aufgebaut sind, so den Eiweißkörpern mit zwei — $CONH_2$ Gruppen, Albumine werden blauviolett (Empfindlichkeitsgrenze 1 : 2000 für Eiweißkörper, 1 : 100000 für Peptone, Neumeister). Spaltlinge, die keinen Eiweißcharakter mehr besitzen, geben die Reaktion, die wahrscheinlich auf Bildung von Biuretkupferoxydkali beruht, nicht mehr. Nicht zu zarte Präparate werden einige Zeit (nach de Wèvre 30 Minuten) in einer konz. wässerigen Kupfersulfatlösung mazeriert, alsdann werden sie in Wasser gut abgespült und schließlich auf dem Objektträger in einen Tropfen konz. Kalilauge (meist 50 %, auf 1 Stunde) gelegt. Eiweiß wird schmutzig rot bis blauviolett. Meist erhält man unklare Bilder, selbst dann, wenn man zuvor Zucker und Glykoside entfernt oder die Präparate mit Alkohol behandelt hat. Durch Erwärmen gewinnt die Reaktion etwas an Schärfe. Ein weiterer Nachteil der Reaktion besteht darin, daß die Färbungen weder in Wasser noch in Glyzerin haltbar sind, auch in Kalilauge nach kurzer Zeit (einigen Stunden) verblassen. Wie die isolierten Eiweißsubstanzen einen verschiedenen Farbenton bei der Reaktion zeigen (Maisalbumin und Kürbisvitellin violett, Erbsenlegumin mehr rot, Roggen- und Weizenfibrin mehr blau, Peptone purpurrot), so finden wir bei der mikrochemischen Reaktion ebenfalls verschiedene Farbentöne, die hier überdies wesentlich von der Dichte der betreffenden Eiweißkörper und der Stärke der Präparate abhängen. Zuweilen läßt sich diese Farbenreaktion besser mit bloßem Auge beurteilen, indem man das Präparat über eine weiße Unterlage hält. Mikroskopisch ist die Färbung schwieriger zu bestimmen. So zeigen die Eiweißstoffe der Kotyledonen von Amygdalus bei makroskopischer Betrachtung eine blaue Färbung mit einem Stich ins Violette, während man unter dem Mikroskop keine bestimmte Farbe erkennen kann. Wenig brauchbare Resultate gaben die Samen von Strychnos, Coffea, Myristica u. a. Jedenfalls ist die Biuretreaktion in der Mikrochemie weit weniger brauchbar als makrochemisch.

Die Aldehydreaktionen von Reichl und Mikosch[2]) sind in der Praxis, wie es scheint, recht wenig ausprobiert worden. de Wèvre bezeichnet speziell die Benzaldehyd-Reaktion als die am wenigsten empfindliche Eiweißreaktion: im allgemeinen liefern aber die Aldehyd-

[1]) H. Schiff, Ber. chem. Ges., 1896, XXIX 1, S. 298.

[2]) C. Reichl, Eine neue Reaktion auf Eiweißkörper, Monatsheft f. Chem., 1889, X, 317 und Monatsheft f. Chem., 1890, XI, S. 155; C. Reichl u. C. Mikosch, Über Eiweißreaktionen und deren mikrochemische Anwendung, Jahresber. Oberrealschule, II. Bez., Wien, 1890, S. 34.

reaktionen als Hilfsreaktionen ganz brauchbare Resultate. Sie erfordern jedoch eine vorsichtige Beurteilung. Nachteile der Reaktion sind die lange Dauer der Ausführung (die Präparate müssen mehrere Stunden, oft 24 Stunden, mit dem betreffenden Aldehyd behandelt werden) und die starke Säure (welche die Präparate ziemlich schnell löst). Benutzt werden Anisaldehyd, Salizylaldehyd, Zimtaldehyd, Benzaldehyd, Vanillin in $\frac{1}{2}$—1% alkoholischen Lösungen, in welchen die Präparate bis 24 Stunden belassen werden. Alsdann gelangen sie auf den Objektträger, werden mit Fließpapier abgetrocknet und unter Deckglas mit einer Mischung gleicher Volum. Wasser und Schwefelsäure, die einige Tropfen Eisensulfat enthält, versetzt. Die Reaktion tritt oft nicht sofort ein, durch Erwärmen kann sie beschleunigt und verschärft werden. de Wèvre läßt nur 2 Stunden Benzaldehyd einwirken, trocknet ab und erwärmt auf dem Objektträger in 1—2 Tropfen Säure. Die Eiweißstoffe werden rot, violett und blau, nur bei Anwendung von Zimtaldehyd entstehen orangegelbe Farben. Bei diesen Reaktionen ist aber Grundbedingung, daß Alkaloide und Glykoside, sowie möglichst die Enzyme vorher aus den Präparaten entfernt werden, denn Coniferin, Nuklein, Papain werden hierbei blau, Emulsin, Pepsin, Veratrin violett, Solanin, Salicin, Narcein mehr oder weniger rot. Auch Spaltungsprodukte beeinflussen die Reaktion.

Die eisenhaltige Schwefelsäure ist durch Salzsäure ersetzbar; wenigstens ist dies bei der Vanillinreaktion der Fall. Winckel[1]) fand, daß Querschnitte fettreicher und Reservezellulose führender Samen mit Vanillinsalzsäure rotviolett werden, und vertrat die Ansicht, daß diese Reaktion durch Enzyme bedingt werde. Demgegenüber wies Rosenthaler[2]) darauf hin, daß Albumin, Globulin, Kasein, vor allem auch Tryptophan die Reaktion geben. Winckel konnte nicht ermitteln, welcher Teil des Querschnittes (Membran oder Zellinhalt) die violette Färbung annimmt. Tunmann[3]) stellte fest, daß Membran, Plasma und Öl ungefärbt bleiben und daß nur die Aleuronkörner nach längerer oder kürzerer Zeit eine violette bis rötliche Farbe annehmen. Es läßt sich dieser Befund sehr genau verfolgen, wenn man die Präparate direkt in Vanillinsalzsäure einträgt. Nach dem Absaugen des Reagens erzielt man mit Jodreagentien weitere Eiweißreaktionen. Die Vanillinsalzsäurefärbung ist somit eine Eiweißreaktion, die Tryptophangruppen anzeigt. Sie hat vor der Reaktion von Reichl-Mikosch den Vorzug, daß die Präparate durch die Säure nicht gelöst werden. Übrigens

[1]) M. Winckel, Anwendung der Vanillinsalzsäurereaktion zum Nachweis von Fermenten, Apoth.-Ztg., 1905, XX, S. 209.

[2]) L. Rosenthaler, Vanillinsalzsäure als Reagens auf Eiweiß und Tryptophan, Apoth.-Ztg., 1907, XXII, S. 678.

[3]) O. Tunmann, Untersuchungen über die Aleuronkörner einiger Samen, Pharm. Zentralh., 1909, L, S. 525.

gibt Hühnerei-Albumin ebenfalls eine violette Reaktion mit Vanillinsalzsäure[1]. Bemerkt sei schließlich, daß nach mehrfachen Versuchen Salzsäure allein die Reaktion bei gewöhnlicher Temperatur selbst nach 24 Stunden nicht hervorruft. Erhitzt man aber mit starker Salzsäure, dann entsteht, wie auch Correns[2]) angibt, zuweilen eine rötliche Färbung, die aber nicht gleichmäßig erscheint und wahrscheinlich sehr von der angewendeten Temperatur beeinflußt wird. Salzsäure gibt mit verschiedenen Alkaloiden und Glykosiden ebenfalls Rotfärbung (Physostigmin, Solanin, Veratrin, Convallamarin u. a.).

Die Tryptophangruppe gibt ferner eine Farbenreaktion mit Dimethylaminobenzaldehyd.

Die von Raspail[3]) 1829 aufgefundene Farbenreaktion, die früher häufig zum Eiweißnachweis benutzt wurde, verdient nur historisches Interesse. Versetzt man Präparate mit einer konzentrierten wässerigen Rohrzuckerlösung und läßt Schwefelsäure einwirken, dann färben sich viele Eiweißkörper rot bis violett. Es färben sich nun nicht alle Eiweißstoffe und dann reagieren bekanntlich Glykoside, Alkaloide, Gerbstoffe u. a. in gleicher Weise. So wird von Rohrzucker und Schwefelsäure mehr oder weniger rot: Phenol, Brenzkatechin, Pyrogallol, Resorcin, Pyrrol; Phloroglucin wird gelbrot, beim Erwärmen rotbraun. Bei dieser Unsicherheit sieht man am besten ganz von der Reaktion ab. Der zur Reaktion nötige Zucker ist übrigens sehr oft in den Objekten enthalten (im Endosperm vieler Samen, Coffea, Strychnos), so daß Schwefelsäure allein die Raspailsche Reaktion hervorruft. In solchen Fällen kann die Reaktion nebenher als Fingerzeig dienen. Doch müssen dann Kontrollversuche ausgeführt werden mit Präparaten, denen der Zucker durch gutes Auswaschen mit warmem Wasser entzogen ist. Hierbei bleibt Voraussetzung, daß andere mit Schwefelsäure rot werdende Substanzen fehlen. Nach Mylius[4]) beruht die Reaktion auf Furfurolbildung.

Die Mesnardsche Reaktion[5]), auf Tryptophanabspaltung beruhend, färbt Eiweißstoffe ebenfalls rot, ist mit den gleichen Nachteilen behaftet wie die von Raspail, schont jedoch die Präparate. Die Schnitte werden auf das Deckglas in einen Hängetropfen von stark zuckerhaltigem Glyzerin gebracht und den Dämpfen einer konz. Salzsäure ausgesetzt. Es kann die auf S. 226 beschriebene Vorrichtung benutzt werden, oder man bringt den Glyzerintropfen auf einen Objekt-

[1]) C. Reichard, Farbenreakt. d. Eiweißkörper, Eier-Albumin, Pharm.-Ztg., 1910, LV, Nr. 16.

[2]) C. Correns, Über die vegetabilische Zellmembranen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1894, XXVI, S. 600.

[3]) Raspail, Annales des sciences d'observation, 1829, I, S. 72 und: Chimie organique, 1839, II, S. 139. Unabhängig von Raspail hat M. Schultze die gleiche Reaktion gefunden, Ann. d. Chem. u. Pharm., LXXI, S. 139.

[4]) Mylius, Ztschr. f. physiol. Chem., 1887, XI, S. 493.

[5]) E. Mesnard, Recherches sur la localisation des huiles grasses dans la germination des graines, Compt. rend., 1893, CXVI, S. 111.

träger, trägt die Präparate ein und hält den Objektträger über die Öffnung der Salzsäure-Flasche.

Die Reaktion von Adamkiewicz[1]), Eintragen der Schnitte in einen Tropfen eines Gemisches von gleichen Vol. konz. Schwefelsäure und Eisessig[2]), die durch Erwärmen beschleunigt werden kann, ruft meist nur eine sehr schwache Rötung hervor; zuweilen bleibt die Reaktion, die auf der Gegenwart von Skatol- und Indolgruppen beruht (Tryptophan), ganz aus und ist ebenso wenig beweisend wie die Alloxan-Reaktion Krassers (Sitzb. Wien. Akad., 1886, XCIV, S. 135. Eingetrocknete Schnitte werden mit einer konz. wässerigen oder alkoholischen Lösung von Alloxan versetzt, Rotfärbung). Über die Reaktion von Axenfeld s. Aleuronfärbung.

Die Reaktion mit α-Naphthol (Thymol) und Schwefelsäure, die Molisch für Zucker (S. 191) empfahl, gibt mit Eiweißkörpern eine violette (rote) Färbung, die auf Zusatz von Alkohol, Äther oder Kalilauge in Gelb übergeht (Seegen). Bei pflanzlichen Geweben wird sie nicht benutzt. — Auch die Schwefelblei-Reaktion wird kaum benutzt. Da fast alle Eiweißkörper schwefelhaltig sind, so entsteht beim Kochen mit Kalilauge und einem Bleisalze ein schwarzer Niederschlag oder doch eine Braunfärbung.

Vielleicht läßt sich die von Arnold[3]) angegebene Reaktion auf das mikrochemische Gebiet übertragen. Versetzt man 1—2 ccm der wässerigen Lösung eines Eiweißkörpers mit 2—4 Tropfen einer 4%igen Lösung von Nitroprussidnatrium und einigen Tropfen Ammoniak, so tritt eine starke Purpurrotfärbung ein, die längere Zeit beständig ist und sich bei Zusatz von Essigsäure sofort entfärbt. Um eine Abspaltung von Alkalisulfid handelt es sich nicht, da dessen Reaktion anders verläuft (violette Färbung, die bald blau wird). Die Reaktion wird nicht von allen Eiweißkörpern gegeben, wohl aber von Peptonen, Albumosen u. a. — Von den von Reichard[4]) angegebenen Reaktionen kämen für unsere Zwecke möglicherweise folgende in Betracht: Verreibt man Hühneralbumin mit einem der nachstehend genannten Reagentien und fügt dann Schwefelsäure hinzu, so erhält man mit Ammoniumheptamolybdat eine dunkelblaue, mit Titansäure eine schwarzrötliche, mit Jodsäure (als Natriumsalz angewandt) unter Jodabscheidung eine gelbe Färbung. —

Ob der Inhalt des einschichtigen Perisperms des Acorus-Samens aus einer eiweißartigen Substanz besteht, wie Mücke[5]) meint, erscheint noch fraglich. Der strukturlose Inhalt wird mit Chlorzinkjod braunrot und löst sich langsam, Jodjodkalium färbt braunrot, bei nachfolgendem Schwefelsäurezusatz erfolgt blau-

---

[1]) Adamkiewicz, Ber. chem. Ges., 1875, VIII, 1, S. 161.

[2]) Die käufliche Säure enthält stets Glyoxylsäure, welche die Reaktion veranlaßt.

[3]) W. Arnold, Eine neue Farbenreaktion auf Eiweißkörper, Chem. Ztg., 1910, XXXIV, S. 332.

[4]) C. Reichard, Über die Farbenreaktionen der Eiweißkörper, Eier-Albumin, Pharm. Ztg., 1910, LV, Nr. 16 u. 17.

[5]) M. Mücke, Über den Bau u. d. Entw. der Früchte u. über. d. Herkunft von Acorus calamus L., Bot. Ztg., 1908, LXVI, S. 1.

violette Lösung. Sonst erwies sich der Inhalt unlöslich, so in Eau de Javelle (!), Chloralhydrat, Kalilauge, Ammoniak, färbte sich aber in frisch bereiteter Millonscher Lösung rosarot und löste sich anderseits in Kupferoxydammoniak. Bei der Hydrolyse mit Salzsäure entstand kein Zucker.

Nukleoproteide.

Von den zusammengesetzten Eiweißverbindungen (den Proteiden, S. 409) sind die Nukleoproteide hauptsächlich als Bestandteile der Zellkerne in mikrochemischer Hinsicht am meisten studiert worden. Sie zeichnen sich durch hohen Phosphorgehalt aus, sind wohl stets eisenhaltig und speichern bestimmte Anilinfarben, weshalb man sie mikrochemisch als Chromatin zusammengefaßt hat. Bei der Behandlung mit Pepsinsalzsäure geben die Nukleoproteide einen unlöslichen Rückstand, den man als Nuklein bezeichnet und der den gesamten Phosphor (nach Altmann bis zu 9%) enthält. Die Nukleine wiederum spalten sich in Eiweißkomplexe und phosphorhaltige Nukleinsäuren. Von letzteren sind aus Pflanzen die Tritico- und die Hefenukleinsäure isoliert worden, die aber (nach P. A. Levene u. F. B. La Forge) identisch sein sollen. Die Nukleinsäure ist eine Tetrametaphosphorsäure, die an jedem Phosphoratom eine Kohlehydratgruppe enthält, an die je ein Molekül Guanin, Adenin, Thymin und Cytosin gebunden ist.

Auf botanischem Gebiet wurde zuerst von Zacharias[1]) die Unlöslichkeit der Nukleine in Pepsinsalzsäure (künstlicher Magensaft) zum mikrochemischen Nachweis der Nukleoproteide benutzt. In Pepsinsalzsäure, auch in 0,1—0,3% Salzsäure, nehmen die Nukleine ein scharf umschriebenes glänzendes Aussehen an. Sie lösen sich ferner in 10% Chlornatriumlösung, in konz. Natriumkarbonatlösung, verd. Kalilauge, konz. Salzsäure u. a. Später hat Zacharias zum Teil andere Befunde erhalten[2]): „Nach verschiedenartiger Vorbehandlung werden die Chromatinmassen gelöst von konz. Salzsäure und verd. Kalilauge, zur Quellung gebracht durch ammoniakalische Karminlösung, Glaubersalzlösung und Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration. Verd. Sodalösungen wirken in verschiedener Konzentration in differentem Grade quellend und lösend. Destilliertes Wasser, auf frisches Material einwirkend, läßt die Chromatinkörper aufquellen.“ Die Kerne und Nukleolen der Florideen Antithamnion cruciatum und plumula verhalten sich nach Schiller[3]) gegen 10%ige Chlornatriumlösung, konz. Natriumkarbonatlösung und 0,3% Salzsäure wie die Kerne der höheren Pflanze.

---

[1]) E. Zacharias, Über Eiweiß, Nuklein und Plastin, Bot. Ztg., 1883, S. 209.

[2]) E. Zacharias, Die chemische Beschaffenheit von Protoplasma und Zellkern, Progressus rei bot., 1909, III, S. 222.

[3]) J. Schiller, Die Kerne von Antithamnion cruciatum f. tenuissima Hauck und Antithamnion plumula (Ellis) Thur., Jahrb. f. wiss. Bot., 1911, XLIX, S. 269.

Als Nukleinreagens wurde 50% Chromsäure bei Spirogyra benutzt. Zunächst bleibt das Kerngerüst widerstandsfähig gegen Chromsäure, löst sich aber nach einiger Zeit, während die Nukleolen zurückbleiben; nun tritt ein Fadengerüst hervor, welches lange sichtbar bleibt und erst nach dem Auflösen der Wand verschwindet. van Wisselingh[1]) hat die Reaktion mit 50% Chromsäure an mit Flemmingschem Gemisch fixierten Spirogyren erprobt und empfiehlt sie zum Studium der Karyokinese, später auch für andere Objekte (Fritillaria imperialis, Leucojum aestivum)[2]). Bei diesen soll man gute Einblicke erhalten, wenn man die Chromsäurewirkung unterbricht. Die Chromsäure wird mit destilliertem Wasser ausgewaschen, die Kerne, die in der Säure aufgequollen sind, werden etwas kleiner. Fügt man dann „eine nicht zu starke, mit Essigsäure schwach angesäuerte Lösung von Brillantblau extra grünlich (Bayer-Elberfeld) hinzu, so wird das Gerüst oder dessen Rest blau gefärbt".

Ähnliche Resultate liefert Erhitzen der Präparate in Wasser oder in Glyzerin in zugeschmolzenen Glasröhrchen (Glyzerinmethode van Wisselinghs). Das mit Alkohol fixierte Material (mit Flemmingscher Lösung fixiertes ist ungeeignet) kommt nach dem Abtrocknen mit Fließpapier in 1—2 mm weite, 6 cm lange Glasröhrchen, die etwas Glyzerin oder Wasser enthalten und nach dem Beschicken zugeschmolzen werden (Apparat s. unter Chitin). Die Glasröhrchen werden im Ölbade bei Glyzerin auf 230—250°, bei Wasser auf 140—150° erhitzt. Nun werden die Gläschen in der Nähe der Flüssigkeit durchschnitten, mit Wasser aufgefüllt, umgekehrt und mit dem offenen Ende in Wasser (auf dem Uhrglase oder dem Objektträger) getaucht. Derart lassen sich die Präparate leicht aus dem Glasröhrchen herausbringen. Bei der Glyzerinmethode wird „zuerst das Cytoplasma gelöst, darauf die Kernwand und die Kernkörperchen, während das Kerngerüst und die aus demselben entstandenen karyokinetischen Figuren am längsten Widerstand leisten".

Wie schon erwähnt (S. 410) speichern die Nukleoproteide begierig gewisse Anilinfarben und zwar aus Farbstoffgemischen die basischen Farbstoffe, so aus Fuchsin-Methylenblau (s. Zellkern) den blauen, aus Fuchsin-Jodgrün den grünen Farbstoff (Cyanophilie Auerbachs). Diese Färbungen werden, ob mit Berechtigung, bleibe dahingestellt, von vielen Autoren als „chemische" Reaktionen auf Nukleoproteide angesehen. Man ist verschiedentlich der Ansicht, daß die Intensität der

[1]) C. van Wisselingh, Über den Nukleolus von Spirogyra, Bot. Ztg., 1898, LVI, S. 196.

[2]) C. van Wisselingh, Über das Kerngerüst, Bot. Ztg., 1899, LVII, S. 155.

Färbung einen Schluß auf die Menge der anwesenden Nukleine gestattet[1]). Auch wollte man aus den Färbungen sogar auf verschiedenartige Nukleoproteide schließen (?).

Besonders wurde Methylgrünessigsäure von Carnoy[2]) zum Nachweis von Nuklein wiederholt benutzt. Von deutschen Autoren beschäftigte sich Zacharias[3]) eingehend mit diesem Reagens und gab bereits 1882 an, daß in den Kernen von Phajuswurzeln nach Behandlung mit künstlichem Magensaft durch Methylgrünessigsäure (Methylgrünlösung, die auf 100 g Wasser 1 g reine konz. Essigsäure enthält) nur die Nukleinkörper gefärbt werden. Später[4]) behandelte er frische Epidermen der Blätter von Tradescantia und von Leucojum aestivum (letztere auch nachdem sie 48 Stunden in Alkohol gelegen hatten und nachher mit Wasser abgespült waren) mit Methylgrünessigsäure und fand, daß die Leukoplasten sofort verquellen, während die nukleinhaltigen Teile der Kerne sich mehr oder weniger stark färben. Eine schärfere und schnellere Färbung soll eintreten, wenn man die Präparate zuvor auf einen Tag in 0.3% Salzsäure einlegt und mit Wasser abspült. Diese Angabe wurde von Heine[5]) für basische Farbstoffe in Abrede gestellt, nachdem im Gegenteil die Vorbehandlung mit verd. Salzsäure die Empfänglichkeit der Nukleoproteide für Farbstoffe herabsetzen soll.

Miescher[6]) verneinte auf Grund seiner Erfahrungen mit Spermatozoen des Rheinlachses die Färbbarkeit des Nukleins mit Methylgrün. Er benutzte eine Flüssigkeit, die 1% Essigsäure, 9—10% Glaubersalz und ziemlich viel Methylgrün enthielt. Die dicke Hülle des Kopfes, welche Sitz der Nukleinsäure sein soll, färbte sich gar nicht oder nur schwach, während der Innenraum prächtig gefärbt hervortrat. An dem gleichen Objekte kam Zacharias[7]) zu einem anderen Resultat bei Ersatz des Methylgrüns durch Fuchsin S.; Zacharias hatte wiederholt Methylgrünessigsäure zum Nachweis von Nuklein empfohlen[8]) und auch über die

[1]) L. Lilienfeld, Über die Wahlverwandtschaft der Zellelemente zu gewissen Farbstoffen, Verh. physiol. Ges. Berlin, 1892/93, Nr. 11.

[2]) Carnoy, La Biologie cellulaire, Lierre, 1884, S. 211. — Carnoy et Lebrun, La Cellule, 1897, XII.

[3]) E. Zacharias, Über den Zellkern, Bot. Ztg., 1882, XL, S. 656.

[4]) E. Zacharias, Über einige mikrochemische Untersuchungsmethoden, Ber. d. bot. Ges., 1896, XIV, S. 270.

[5]) L. Heine, Die Mikrochemie der Mitose, Ztschr. f. phys. Chemie, 1896, XXI, S. 494.

[6]) Miescher, Physiol.-chem. Untersuch. über die Lachsmilch, herausgegeb. von O. Schmiedeberg, Leipzig, 1896.

[7]) E. Zacharias, Beiträge z. Kenntnis der Sexualzellen, Ber. d. bot. Ges., 1901, XIX, S. 377.

[8]) E. Zacharias, Über Nachweis und Vorkommen von Nuklein, Ber. d. bot. Ges., 1898, XVI, S. 185.

Einwirkung von Glaubersalz-Methylgrünessigsäure Versuche angestellt an den Epidermen von Tradescantia virginica, Orchis latifolia und Leucojum aestivum. Die Erfolge waren verschieden, je nachdem frisches oder Alkohol-Material benutzt wurde.

In neuerer Zeit sagt Zacharias (Lit. S. 418, 2) von den Chromatinmassen: „Nach der Behandlung mit verd. Salzsäure oder Magensaft färben sie sich in einem Gemisch von Methylenblau und Fuchsin S blau. Frisch oder nach Behandlung mit Alkohol, verd. Salzsäure oder Magensaft in Methylgrünessigsäure eingetragen, färben sie sich intensiv grün, ohne zu quellen, desgleichen färben sie sich nach entsprechender Behandlung mit Essigkarmin."

Das Chromatin kann selbstverständlich keine Substanz von feststehenden chemischen und physikalischen Eigenschaften sein. Während der Entwicklungsperioden des Zellkerns wird es mannigfache Umsetzungen erfahren. Auf mikrochemischem Wege hat hierfür Němec[1]) Belege beigebracht. Von den nukleinreichen Chromosomen nahm man lange Zeit an, daß sie sich ebenso wie die Chromatinkörperchen des ruhenden Kernes verhalten. Taucht man jedoch frische meristematische Zellen (lebende Wurzelspitzen, Vicia faba, Allium cepa) auf 30 Sekunden bis 5 Minuten in siedendes Wasser, dann sind die Chromosomen ausgehöhlt oder ganz aufgelöst, während die ruhenden Kerne und Chromatinkörperchen kaum angegriffen werden und ihre Färbungskraft behalten. Die Chromosomen lösen sich ferner fast ganz bei 24stündigem Behandeln mit 1 $^0/_0$ wässeriger Kalilauge. Hier ist somit der Satz A. Fischers[2]) sicher begründet: „Der Begriff des Chromatins kann der morphologischen Merkmale nicht entbehren." Wie vorsichtig man bei allen Reaktionen in den Schlußfolgerungen sein muß, geht daraus hervor, daß Zacharias bei Spirogyra zu einem falschen Ergebnis kam. Tröndle[3]) konnte zeigen, daß der Nukleolus von Spirogyra Sitz des Chromatins ist; er untersuchte außerdem Fritillaria, Vicia faba und Pinus und zwar mit Eiweißreagentien (Millon rot, Jodjodkalium braungelb), Alkalien, Säuren und heißem Wasser.

Kossel[4]) unterscheidet in der Chromatinsubstanz der Zellkerne zwei verschiedene Anteile; der eine ist reich an gebundener Phosphorsäure und hat saure Eigenschaften, der andere ist ein Eiweißkörper mit basischen Eigenschaften.

---

[1]) B. Němec, Zur Mikrochemie der Chromosomen, Ber. d. bot. Ges., 1909, XXVII, S. 43.

[2]) A. Fischer, Fixierung, Färbung u. Bau d. Protoplasmas, Jena, 1899, S. 191.

[3]) A. Tröndle, Der Nukleolus von Spirogyra und die Chromosomen höherer Pflanzen, Ztschr. f. Bot., 1912, IV, S. 721.

[4]) A. Kossel, Über die chemische Beschaffenheit des Zellkernes, Nobelvortrag, Naturw. Rundsch., 1911, XXVI, S. 221.

Da die Nukleoproteide stets Phosphor und meist Eisen führen, so hat man sie mit Hilfe dieser Stoffe ebenfalls nachzuweisen versucht. Die hierbei in Anwendung kommenden Methoden über den Phosphornachweis s. S. 90 und über den Eisennachweis s. S. 125.

Plastin.

Die hochzusammmengesetzten Proteide des Protoplasmas sind noch sehr wenig erforscht. Reinke[1] hat aus den Plasmodien von Aethalium septicum einen in Wasser und Alkohol unlöslichen Körper, Plastin, dargestellt. Plastin führt Schwefel und Phosphor. „Die Verwandtschaft des Plastins mit den Nukleinen wird durch seinen Phosphorgehalt dargetan“, von denen es sich anderseits „durch seine Unlöslichkeit in verd. Alkalien“ unterscheidet. Plastin soll die chemische Grundlage des lebenden Protoplasmas sein. Loew[2] bezweifelt die Reinheit des von Reinke und seinen Mitarbeitern isolierten Plastins. Růžička[3] zählt es zur Gruppe der Albuminoide; das im Plasma und im Kern anwesende Plastin ist sozusagen als Vorläufer der Albuminoide anzusehen. Hierfür sollen weitgehende Übereinstimmungen mit dem Keratin und dem Neurokeratin sprechen.

Plastin wird ebenso wie Nuklein von Pepsinsalzsäure nicht angegriffen; beide Substanzen lösen sich in konz. Salzsäure. Doch unterscheidet sich das Plastin von den Nukleinen dadurch, daß es in 10% Chlornatriumlösung nach Vorbehandlung mit Pepsinsalzsäure nicht verquillt und von verd. Salzsäure (4 + 3) nicht gelöst wird. Es bleibt also nach Entfernung verdaulicher Eiweißkörper aus den Nukleolen durch künstlichen Magensaft im Verdauungsrest Plastin zurück. In Alkalien löst sich Plastin schwerer als Nuklein (Zacharias)[4].

Nach Němec[5] bestehen die Spindelfasern aus Plastin, doch soll dies nach Zacharias nur in bestimmten Fällen zutreffen. Unter der Bezeichnung „Plastin“ faßt Zacharias alle Bestandteile von Protoplasma, Zellkern und Chromatophoren zusammen, welche sich durch die oben angeführten Reaktionen auszeichnen.

Andere Eigenschaften wie das Plastin des Cytoplasmas (Cytoplastin) besitzt das Linin-Karyoplastin (das sogenannte achromatische Kerngerüst). Zu diesem Nachweis eignen sich nach Němec[6]) mit

[1]) J. Reinke u. H. Rodewald, Die chemische Zusammens. d. Protoplasmas von Aethalium septicum, auch: Unters. Bot. Inst. Göttingen, 1881—83.

[2]) O. Loew, Bot. Ztg., 1884, XLII, S. 113.

[3]) V. Růžička, Zur Kenntnis der Natur und Bedeutung des Plastins, Arch. f. Zellforsch. München, 1908, I, 4. Heft, S. 587.

[4]) E. Zacharias, Über Eiweiß, Nuklein und Plastin, Bot. Ztg., 1883, XLI, S. 209.

[5]) B. Němec, Neue cytologische Studien, Fünfstücks Beitr. z. wiss. Bot., 1900, IV 1, S. 83.

[6]) B. Němec, Zur Mikrochemie der Chromosomen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1909, XXVII, S. 43.

Alkohol fixierte oder mit Pikrineisessigschwefelsäure fixierte und mit Alkohol entfärbte Objekte. Am Objektträger aufgeklebte Schnitte kommen auf 24 Stunden in 1 % wässerige Kalilauge. Cytoplasma, Nukleolen und die Fasern der Teilungsspindel sind ungelöst, der sonstige Kerninhalt ist aber vollständig verschwunden.

Volutin (Nukleinsäure).

Seit den Untersuchungen von Ernst[1], der körnchenförmige Einschlüsse in den Bakterien beschrieb, die Farbstoffe leicht und intensiv speichern, sind ähnliche Bildungen vielfach studiert worden, so von Bütschli[2]) bei Oscillarien, von Lauterborn[3] bei Diatomeen und Desmidiaceen u. a. A. Meyer[4] lieferte im Verein mit mehreren Schülern den Beweis, daß alle diese Gebilde aus der gleichen Substanz bestehen, die er Volutin nennt. Makrochemisch ist Volutin noch nicht dargestellt worden. Wahrscheinlich gibt es mehrere Körper ähnlicher Zusammensetzung, mehrere Volutine. Nach den vorliegenden Untersuchungen kann es als sicher gelten, daß die Volutine der Hauptsache nach aus Nukleinsäuren (S. 418) bestehen.

Volutin bildet bläschenartige, farblose, 2—3 μ große und aus einer zähflüssigen Substanz bestehende Gebilde, die sich durch Druck leicht zerquetschen lassen, meist im Cyptoplasma, selten in Vakuolen (Aspergillus, Pinnularia), vereinzelt in Chloroplasten vorkommen. Vielleicht entsteht es in Autoplasten. Volutin gehört zu den Reservestoffen, da Nukleinsäure Stickstoff und Phosphor in organischer Bindung führt. Volutin ist sehr verbreitet bei Pilzen[5], ferner bei Nostocaceen, Peridineen, Diatomeen (dort doppelbrechend), Desmidiaceen, Chlorophyceen, Phaeophyceen, Rhodophyceen, hingegen nicht bei Archegoniaten, Gymnospermen und Angiospermen. Doch hat es A. Meyer für die Globoide der Aleuronkörner von Rizinus und Cucurbita angegeben.

Zum mikrochemischen Nachweis der Volutine werden die Reaktionen von A. Meyer benutzt (zusammengestellt in der Botan. Ztg., 1904, S. 116 u. flg.). Charakteristisch ist die Reaktion mit Methylenblau-Schwefelsäure. Die Präparate kommen unter Deckglas in Methylenblau (1 Vol. gesättigte Methylenblaulösung Ehrlich [von Grübler]

[1]) P. Ernst, Über d. Bazillus d. Xerose u. seine Sporenbildung, Ztschr. f. Hyg., 1888, IV.

[2]) O. Bütschli, Über d. Bau d. Bakterien und verwandter Organismen, Leipzig, 1890 und: Weitere Ausführungen über d. Bau d. Cyanophyceen und Bakterien, Leipzig, 1896.

[3]) R. Lauterborn, Untersuchungen über Bau, Kernteilung u. Bewegung der Diatomeen, Leipzig, 1896.

[4]) A. Meyer, Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins, Bot. Ztg., 1904, LXII, S. 113.

[5]) R. Burri und J. Thöni fanden Volutin auch in Milchsäurebakterien (Centralbl. f. Bakt., 1909, XXIII, S. 32).

+ 10 Vol. Wasser). Bei intensiver Färbung tritt neben Färbung auch Quellung der Volutinmassen ein. Nach einiger Zeit wird die Farblösung abgesaugt und seitlich 1% Schwefelsäure (1 Vol. konz. Schwefelsäure + 99 Vol. Wasser) zugesetzt. Dadurch wird alles entfärbt bis auf die Volutinkörner. Sollten bei 1% Schwefelsäure die Zellkerne oder die Nukleolen noch schwache hellblaue Färbung zeigen, dann empfiehlt sich eine Nachbehandlung mit 5% Schwefelsäure. Gerbstoffe lassen sich vor der Reaktion mit Alkohol entfernen, wodurch zugleich das Material fixiert wird. Das Material kann auch durch 10 Minuten langes Behandeln mit 40% Formaldehydlösung fixiert werden. Die Reaktion mit Methylenblau-Jodjodkalium-Natriumkarbonat besteht darin, daß man nach dem Absaugen der Methylenblaulösung Jodjodkalium zufügt. Das Protoplast wird gelbbraun, Volutin schwärzlich. Zusatz von 5% Natriumkarbonatlösung bringt die Schwarzfärbung nur sehr langsam zum Verblassen. In, mit Karbolfuchsin kräftig gefärbten Präparaten entfärbt 1% Schwefelsäure Cytoplasma und Zellkern, während die Volutinmassen fast schwarz hervortreten.

Volutin färbt sich mit Jodjodkalium und mit Chlorzinkjod nur jodgelb. Mit Osmiumsäure (1%), Vanillinsalzsäure (30 ccm Salzsäure, 5 ccm Wasser, 0,05 g Vanillin), Rohrzuckersirup-Schwefelsäure, Fehling (Kupfersulfat-Seignettesalz-Kalilauge), Millons Reagens (Quecksilber 10 g, Salpetersäure 10 g, Wasser 20 ccm) treten keine Farbenerscheinungen auf. Es ist unlöslich in Chloroform, Äther, Alkohol, löst sich aber in siedendem Wasser (doch nicht wenn das Material vorher wenigstens 30 Minuten lang mit Formol behandelt war), ferner in frisch bereitetem Eau de Javelle, in frisch bereiteter wässeriger Chloralhydratlösung (5 + 2), in konz. Natriumkarbonatlösung, in 5% Salzsäure und in 25% Salpetersäure.

Enzyme.

Enzyme sind Körper, die in kleinster Menge Reaktionen veranlassen, ohne selbst in qualitativer und quantitativer Hinsicht eine Veränderung zu erleiden (Kontaktwirkung). Sie besitzen die Eigenschaft von Katalysatoren, sind jedoch in reinem Zustande noch nicht isoliert worden. Sie sind kolloide stickstoffhaltige, durch Alkohol und Neutralsalze fällbare Körper von proteidem Charakter. Durch konz. Säuren und Alkalien, höhere Temperaturen, Gifte, fluoreszierendes Licht wird ihre Wirkung aufgehoben, die Enzyme werden abgetötet. Am Stoffwechselprozeß (Auf- und Abbau der Körper) nehmen sie hervorragenden Anteil, besitzen aber nur einen beschränkten Wirkungskreis (für die einzelnen Vorgänge sind ganz bestimmte Enzyme erforderlich). Sie sind in jedem Zellplasma zugegen, doch auch in der Membran (bei Metamorphosen) und wahrscheinlich überall dort, wo wichtige chemische Vorgänge stattfinden. Außerdem kommen in den Pflanzen wie

im tierischen Körper gewisse Enzyme in größerer Menge in besonderen Organen und Zellschichten (Skutellum, Kleberschicht der Gramineen [Drüsengewebe]) und in einzelnen Zellen (Enzymzellen) vor. In diesen Enzymzellen sind keineswegs nur Enzyme zugegen; sie bilden nur einen sehr geringen Teil des Inhaltes, der überwiegend aus geformtem (Kleber) und ungeformtem Eiweiß, Kalziumphosphat, selbst Gerbstoff u. a. besteht.

In neuerer Zeit ist eine ungemein große Anzahl von Enzymen ermittelt worden; die meisten sind jedoch nur sehr wenig erforscht. Wir unterscheiden: hydrolytisch spaltende Enzyme (welche Kohlehydrate, Fette, Glykoside, Eiweiß spalten), oxydierende (Oxydasen) und reduzierende Enzyme (Reduktasen), sowie Gärungsenzyme. Näheres bei H. Euler (Enzyme, Ztschr. f. phys. Chem., 1912, LXXVIII) u. a. Das in mikrochemischer Hinsicht Ermittelte ist in den Hauptzügen im folgenden gebracht.

Kohlehydratspaltende und oxydierende Enzyme.

Diastase, aus dem wässerigen Auszuge frischen gepulverten Gerstenmalzes gewonnen, kann in trockenem Zustande bis auf 120° erhitzt werden, ohne die Wirkung zu verlieren, bei 60° liegt die optimale Wirkungstemperatur. Eine wirksame Diastaselösung gibt folgende Vorschrift[1]: 10,0 fein zerriebenes Luftmalz + 1 Liter Wasser + 2 ccm Chloroform zehn Stunden bei 15° mazeriert. Das Filtrat wird mit etwas Chloroform versetzt; diese Diastaselösung behält, vor Licht geschützt aufbewahrt, kürzere Zeit ihre Wirksamkeit. Wir unterscheiden (Brown u. Morris, Journ. Chem. Soc., 1890 u. folg.): Cytasen, welche Membrankohlehydrate verarbeiten, Translokationsdiastasen, die die Wanderung der Stärke ermöglichen, und Sekretionsdiastasen, welche die Kohlehydrat-Reservestoffe für den Embryo aufnahmefähig machen. Diastasen finden sich im ruhenden und keimenden Samen (nicht in Mandeln), Knollen, Wurzeln, Pollen usw.

Die **Sekretionsdiastase** im Gramineensamen entsteht in der Kleberschicht (Fig. 113). Während der Keimung entwickeln sich die Zellen dieser Schichte unter Verbrauch der in ihnen enthaltenen sehr kleinen Aleuronkörner (Kleber) zu lebenstätigen Drüsenzellen, die in das benachbarte Endosperm zur Verzuckerung der Stärke Diastasen ausscheiden. Haberlandt[2]) schnitt aus keimenden Getreidekörnern mehrere Quadratmillimeter große Stücke der Fruchtschale aus. Die anhaftende Kleberschicht wird mit 1—2% Zuckerlösung sorgfältig abgespült und mit einer dünnen Schicht von Stärkebrei bedeckt. Nach 24 Stunden, unter feuchter Glasglocke aufbewahrt, sind die Stärkekörner korrodiert und zerbröckelt. Bei mechanischer Abtrennung der

[1]) H. Linz, Beiträge zur Physiologie der Keimung des Mais, Jahrb. f. wiss. Bot., 1896, XXIX, S. 272.

[2]) G. Haberlandt, Die Kleberschicht des Grasendosperms als Diastase ausscheidendes Drüsengewebe, Ber. d. bot. Ges., 1890, VIII. S. 40.

Kleberschicht wird übrigens die zur Mobilmachung der Stärke erforderliche Diastase in den Endospermzellen selbst gebildet[1]).

Grüss[2]) benutzt die Guajakreaktion, eine mit absolutem Alkohol hergestellte Lösung von Guajakharz (dunkelbraun und frei von Äther, am besten 1 : 10) und Wasserstoffsuperoxyd (H_2O_2). Viele Enzyme (oder ihre Beikörper, Jacobson) machen aus H_2O_2 Sauerstoff frei, welcher die Guajakonsäure des Guajakharzes oxydiert (Hadelich). Die Objekte gelangen in die Guajaklösung und werden nach Abdunsten des Alkohols in eine „mehr oder weniger verd. Lösung" von H_2O_2 übertragen. Der Niederschlag ist je nach der Menge der anwesenden Diastase hell- bis schwarzblau gefärbt und in Wasser unlöslich, löst sich aber in Äther, Benzol, Chloroform, Schwefelkohlenstoff. Zur Einbettung der Schnitte dient flüssiges Paraffin (Luftblasen werden durch Erwärmen entfernt) oder ätherfreier Kanadabalsam. — Man kann auch den zu untersuchenden Pflanzenteil auf 10 bis 15 Minuten in Guajaklösung bringen, den Alkohol abdunsten lassen und schließlich die Oberfläche mit H_2O_2 überpinseln. Nun erst wird von der Oberfläche ein feiner Schnitt angefertigt und nach dem Abtupfen mit Fließpapier mikroskopisch untersucht. Die Reaktion ist nicht eindeutig. Sie tritt nicht mit allen Diastasen ein (nicht mit dem diastatischen Enzym in Penicillium glaucum) und wird durch Gerbstoffe, schwache Säuren, Brasilin, Hämatoxylin, Cyanwasserstoff, Phloroglucin, Brenzkatechin, Hydrochinon u. a. verhindert. Anderseits erfolgt sie mit vielen oxydierenden Stoffen (Chromsäure, Eisen- und Kupfersulfat u. a.) und mit organischen Körpern (Eiweiß, Pepton). Außerdem geben Oxydasen (die nicht hydrolytisch wirksam sind) ebenfalls die Reaktion. Die Reaktion mit Guajak-H_2O_2 auf Diastase muß experimentell gestützt werden. Das, die Bläuung gebende Gewebe muß isoliert und mit ihm oder mit seinem Preßsaft die diastatische Wirkung auf Stärke festgestellt werden. Zu diesem Zwecke bestreicht man eine Glimmerplatte mit Stärkegelatine und stellt diese in Chloroformdampf auf. Man läßt das ausgeschnittene Gewebestück auf der sterilen Stärkeplatte mehrere Tage liegen[3]). Mit Jodzusatz ist nun um das Präparat eine Stärkelösungszone zu erkennen. Für den experimentellen Nachweis liegen die Bedingungen bei den Gramineen insofern recht günstig, da eine mechanische Abtrennung der Kleberschicht und des Skutellums leicht durchführbar ist.

---

[1] W. Pfeffer, Über die Ursachen der Entleerung der Reservestoffe aus Samen, Sächs. Ak. Sitzber., 1893, S. 422 und: B. Hansteen, Flora, 1894, LXXIX, S. 419.

[2]) J. Grüss, Diast. i. Pflanzenk., Ber. d. bot. Ges., 1895, XIII, S. 2.

[3]) J. Grüss, Oxydasen u. d. Guajakr., Ber. d. bot. Ges., 1898, XVI, S. 129.

Das Eindringen der Diastase in die Zellwände bei der Keimung der Samen wird durch ein verändertes Verhalten der betreffenden Wände gegenüber Farbstoffen angezeigt. Grüss bringt Gerstenkörner zur Keimung auf 2 bis 3 Tage in feuchten Sand, teilt die Körner in der Längsfurche, bestreicht die Oberfläche mit Gummiarabikum und läßt sie lufttrocken werden. Sie sind nun gut schneidbar. Die Präparate werden auf dem Objektträger mit Kongorot versetzt. Nach dem Auswaschen des Farbstoffes erscheinen die unveränderten Wände tiefrot, die diastasehaltigen mehr oder weniger ungefärbt. Beim Endosperm des Mais verhalten sich die Wände gerade umgekehrt.

Von Wiesner (Sitzb. Wien. Ak., 1885, XCII, 1, S. 41) wurde zum Diastasenachweis Aufkochen der Präparate mit Orcinsalzsäure empfohlen. Violettfärbung sollte Diastase anzeigen. Die Reaktion, die bekanntlich auf Furfurolbildung beruht (F. Reinitzer, Ztschr. phys. Chem., 1887, XIV, S. 453), zeigt aber auch Kohlehydrate an.

Zum Nachweis von **Cytase** im Kirschgummi läßt man eine Lösung farbloser, frisch ausgeflossener Gummistücke auf Hemizellulosemembranen einwirken (gefärbte Gummimassen enthalten meist keine Cytase, Grüss[1])). „Einige Tropfen Gummilösung werden auf einem Deckgläschen von 3,5 qcm ausgebreitet, worauf man zu den Kotyledonschnitten (der Lupine, deren Verdickungsschichten hauptsächlich aus Galaktan bestehen) ein wenig Thymolpulver hinzusetzt. Das so zubereitete Deckgläschen kittet man mit Paraffin auf einen hohlen Glasklotz, dessen Höhlung ein wenig Wasser mit Toluol oder Thymol als Antiseptikum enthält. Ist Cytase vorhanden, so kann man schon nach einigen Tagen unter dem Mikroskop an den sekundären Verdickungsschichten die charakteristischen Veränderungen wahrnehmen. Es ist nötig, die Schnitte in der Gummimasse von Zeit zu Zeit zu verschieben.“ Die Reaktion erfolgt bei der Lupine nach einigen Tagen, bei Holzmembranen erst später (innerhalb einiger Monate).

Oxydierende Enzyme, Oxydasen, bewirken Sauerstoffaufnahme in das Molekül eines oxydierbaren Körpers, Alkohole werden zu Aldehyden oder zu Säuren (Alkoholasen), Aldehyde zu Säuren (Aldehydasen) oxydiert. Enzyme, die das Oxydationsvermögen der Oxydasen erhöhen, nennt man Peroxydasen. Oxydasen zerstören oft beim Trocknen der Pflanzen und beim Lagern der Drogen die wirksamen Bestandteile; sie führen Gerbstoffe in Phlobaphene über usw.

Zum mikrochemischen Nachweis kann die Guajak-H_2O_2-Reaktion benutzt werden[2]). In der ruhenden Kartoffel sind mehrere Oxydasen

[1]) J. Grüss, Über d. Verhalten v. Cytase u. Cytokoagulase b. d. Gummibildung, Jahrb. f. wiss. Bot., 1910, XLVII, S. 391.

[2]) Nach Groeger, (Ztschr. Nahr.- u. Genußm., 1908, XVI, S. 66) gibt es im Handel zum makrochemischen Nachweis von Peroxydasen Guajaklösungen, die ohne Zusatz von H_2O_2 wirken (Bezugsquelle: H. Hauptner, Berlin NW.).

nachweisbar. So sind nach Grüss unter der Rinde Enzyme, die den Sauerstoff der Luft auf Guajak zu übertragen vermögen und die durch Alkohol zerstört werden (α-Oxydasen). Werden nun Schnitte der Kartoffel von den α-Oxydasen befreit, indem man sie mehrere Tage in Alkohol beläßt, dann fällt nach dem Abdunsten des Alkohols in den Präparaten abermals die Guajakreaktion positiv aus (β-Oxydasen, Peroxydasen). Ein drittes Enzym läßt sich an, mit einem Korkbohrer durchbohrten Kartoffeln nachweisen, die man (zwecks Bildung von Wundparenchym) 1 bis 2 Wochen liegen läßt. Querschnitte solcher Kartoffeln werden eine Stunde bei Siedetemperatur gehalten. Nach dem Abdunsten des Alkohols erhält man mit Guajak und H_2O_2 Blaufärbung im Wundperiderm des Bohrungskanals, das stärkeführende Parenchym bleibt farblos (γ-Oxydasen). — Auch bei Gegenwart von Oxydasen bleibt die Guajak-H_2O_2-Reaktion aus, wenn die S. 426 angeführten Stoffe oder Zucker anwesend sind, so daß bei Saccharum officinarum die Beziehungen zwischen dem Auftreten der Oxydasenreaktion und der Lokalisation der Glykosen klar hervortreten[1]).

Zum Nachweis von Oxydasen und Peroxydasen sind noch weitere Methoden zur Anwendung gekommen. Leider sind die Vorschriften (Stärke der Reagentien, Dauer ihrer Einwirkung u. a.) nicht genügend eingehend gehalten, so daß nicht immer ersichtlich ist, ob man sich an die makrochemische Vorschrift zu halten hat oder nicht. Zum Nachweis von Tyrosinase benutzt Czapek[2]) α-Naphthol und Paraphenylendiamin in alkalischer Lösung (Paraphenylendiamin wird durch den frei werdenden Sauerstoff zu Indophenol oxydiert, welches sich in Alkalien mit roter Farbe löst). Blaue Fällungen entstehen, wenn man die Präparate auf 2 Minuten in eine 1%ige schwach alkalische Lösung von α-Naphthol bringt und dann auf 2 Minuten in eine 1%ige Lösung von Dimethylparaphenylendiamin. Auch Tetramethylparaphenylendiaminchlorid (in verd. wässeriger Lösung) wird empfohlen und als günstiges Versuchsobjekt von Parasiten (Mistel) befallene Pflanzenteile. Die Schnittfläche wird mit der Lösung bestrichen. Das Holz wird schwach, die Rinde stark violett gefärbt. Die Färbung der Rinde geht, falls Gerbstoffe zugegen sind, in Blau über. Die Aminooxydase in der Mistel wird nach Grüss[3])

[1]) T. Hunger, Über die reduzierenden Körper der Oxydase- und Peroxydasereaktion, Ber. deutsch. bot. Ges., 1901, XIX, S. 374.

[2]) Fr. Czapek, Stoffwechselprozesse in der geotropisch gereizten Wurzel, Ber. d. bot. Ges., 1902, XX, S. 405.

[3]) J. Grüss, Peroxydase, das Reversionsenzym der Oxydase, Ber. d. bot. Ges., 1903, XXI, S. 356.

ebenso nachgewiesen, doch werden die Schnitte zuvor einige Stunden in Azeton und in eine Mischung von Äther-Azeton, der etwas Glyzerin zugesetzt ist, gelegt.

Zum Nachweis von **Peroxydasen** in Schnitten eignet sich nach Grüss[1]) weinsaures Ursol. Eine gesättigte alkoholische Ursollösung[2]) wird einer gesättigten alkoholischen Weinsäurelösung zugefügt, der weiße Niederschlag von Ursoltartarat wird gesammelt, mit Alkohol ausgewaschen, mit Äther umkristallisiert. Etwas Ursoltartarat wird in Wasser gelöst und die Lösung mit H_2O_2 versetzt. Mit diesem stets frisch zu bereitendem Reagens werden die Schnitte auf dem Objektträger behandelt. Zellen mit Peroxydasen färben sich grün, dann blau, schließlich schieferfarbig.

Leptomin hat Raciborski[3]) einen Sauerstoff übertragenden Körper genannt, der im Leptom (daher die Bezeichnung), speziell in den Siebröhren und Geleitzellen sowie in den Milchröhren der Gefäßpflanzen auftritt, in Glyzerin und Wasser löslich, in Alkohol unlöslich ist und durch kurzes Erwärmen auf 95° zerstört wird. Leptomin ist ein amorphes weißes Pulver, das von verd. Alkalien (Ammoniak. Kalkwasser) nicht angegriffen, von verd. Essigsäure oder von Pikrinsäure aber zerstört wird. Im Stengel von Saccharum zeigt Guajaklösung durch Bläuung Oxydasen im Parenchym an, die Leptomteile reagieren nicht. Befreit man den Stengelteil von Oxydasen durch Eintauchen in absoluten Alkohol oder durch Erhitzen auf 60°, so erhält man mit Guajaklösung allein keine Reaktion: Guajaklösung und wenig H_2O_2 zeigt aber durch tiefblaue Farbenreaktion in den Siebteilen das Leptomin an. Tote Pflanzen geben die Reaktion nicht mehr.

Die gleiche Beobachtung haben J. Jamieson (Respiration of Pl., Just Jahrb. 1878, I, S. 624) an Früchten und Knollen und Grüss (Lit. S. 426, 3) an stärkeren Stengelquerschnitten von Platanus, Betula. Salix, Pirus, Picea u. a. gemacht. Die Guajakreaktion tritt nicht scharf auf, auch die benachbarten leptominfreien Zellen zeigen sie mehr oder weniger. Raciborski[4]) verwendete daher außerdem α-Naphthol[5])

---

[1]) J. Grüss, Abhandl. üb. Enzymwirk., Ztschr. f. Pflzkrankh., 1907, XVII, S. 65.

[2]) Ursol, auch Ursol D, ist aber ein für technische Zwecke von der A.-G. für Anilinfarben, Berlin, hergestelltes Paraphenylendiamin.

[3]) M. Raciborski, Ein Inhaltskörper des Leptoms, Ber. deutsch. bot. Ges., 1898, XVI, S. 52 u.: Weitere Mitteil. über das Leptomin, Ber. deutsch. bot. Ges., 1898, XVI, S. 119.

[4]) M. Raciborski, Einige Demonstrationsversuche mit Leptomin, Flora, 1898, LXXXV, S. 362.

[5]) Eine 15% alkoholische Naphthollösung wird bis zur beginnenden Ausscheidung von Naphthol mit Wasser verdünnt; Einwirkung 3—10 Stunden.

und H_2O_2. Die eintretende Violettfärbung genügt für mikroskopische Zwecke und hält sich in Dauerpräparaten (in Glyzerin besser als in Kanadabalsam). Wir haben es bei der Leptominreaktion jedenfalls mit einer Oxydase zu tun (was allerdings Raciborski verneint), die teils eine Translokationsdiastase ist, wie Grüss meint, der die Reaktion auch im stärkeführenden Parenchym der ruhenden Kartoffel antraf, teils aber eine andere Oxydase zu sein scheint, da sie auch in der Epidermis im Bast, Kollenchym und Phellogen auftritt.

In neuerer Zeit wurde von Grüss [1]) zur Enzymbestimmung als Hilfsmittel die Kapillaranalyse herangezogen. Die Methode, **Chromogramm-Methode,** wendet gleichzeitig Diffusion und Kapillarattraktion an. Benutzt wird ein ausgespanntes Filtrierpapier, das etwas angefeuchtet wird: auf die angefeuchtete Stelle bringt man einen Tropfen Zellsaft oder die zu untersuchende Substanz (Sekretmasse). Die Kapillarisation muß unter antiseptischen Bedingungen und unter Ausschaltung der Luft in einem dampfgesättigten, ev. mit Wasserstoff angefüllten Raum vor sich gehen. Dann werden Reagentien zugefügt, die intensive Färbungen geben. Die Arbeitsweise ist aus den folgenden Beispielen ersichtlich: Man läßt einen Tropfen Zellsaft von Pteris aquilina, der schwach alkalisch gemacht wurde, in der angegebenen Weise unter Wasserstoff kapillarisieren. Nach beendeter Kapillarisation wird mit Wasser und dann mit einer sehr verd. Lösung von Tetramethylparaphenylendiaminchlorid angefeuchtet. An der Luft entsteht ein violettes Zentrum (Oxydase), welches von einer farblosen Zone (Antioxydase) umgeben ist, außerhalb der eine langsame Autoxydation erfolgt. Läßt man den Zellsaft an der Luft aufsaugen, so entsteht nach einiger Zeit ein rotbraunes Feld, aus dem in Essigsäuredampf eine Außenzone herausrückt: Guajaktinktur-H_2O_2 färbt, auf das ganze Feld gebracht, die Außenzone blau (Peroxydase). — Ein anderer Versuch: Man läßt unter Wasserstoff einige Tropfen eines alkoholischen Auszuges aus unfermentierten Kakaobohnen kapillarisieren und läßt „etwas entfernt davon den zweimal unter Wasserstoff kapillarisierten Zellsaft aus den Parenchymzellen der Kartoffelknollen auffallen. Berühren sich beide Felder in Gegenwart von Sauerstoff, so schlägt an der Berührungsstelle der violette Farbstoff in braun um“ (Oxydasewirkung). Das bei Ausschluß des Luftsauerstoffes gewonnene Kapillarisationsfeld des Kartoffelzellsaftes gibt mit Ursoltartarat-H_2O_2 in der peripheren Grenzlinie eine schieferfarbige Färbung (Peroxydase-

[1]) J. Grüss, Botanische Mikrochemie, Naturf. Vers., Königsberg 1910, Verh. II 1, S. 72.

wirkung). Man kann auch nach erfolgter Kapillarisation das kreisförmige Feld in die erforderliche Anzahl Sektoren zerlegen, die dann mit den betreffenden Reagentien behandelt werden[1]).

Interzellulare Oxydasen weist Raciborski[2]) mit sehr verd. Lösungen von Benzidin und α-Naphthylamin nach, die er durch die lebende Pflanze aufnehmen läßt, ev. durch Aussalzen mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung in Schnitten. Wasserpflanzen (Nymphaea-Arten) sind geeignete Versuchspflanzen.

Glykosidspaltende Enzyme.

Emulsin spaltet nicht nur das Amygdalin, sondern auch die Glykoside Arbutin, Coniferin, Populin, Salicin u. a. Emulsin findet sich in Samen, Blättern, Rinden u. a. der Rosaceen (bes. d. Prunoideen und Pomoideen). Emulsinartige Enzyme, die aus Amygdalin Blausäure abspalten, kommen in Manihot util., in Pilzen (Aspergillus n., Polyporus sulf.) und Flechten (Parmelia, Cladonia, Usnea) vor. Es enthält Stickstoff und Schwefel. Seine Reindarstellung ist noch nicht gelungen. Die Handelspräparate führen oft Kohlehydrate (Arabane). Emulsin findet in der Mikrochemie Verwendung. Die erforderliche Lösung stellt man durch Erwärmen in Wasser her. Eine brauchbare Lösung gibt nachstehende Vorschrift: 10—12 süße Mandeln werden 1 Minute in heißes Wasser getaucht, von den Schalen befreit und mit 30 ccm Wasser verrieben. Man setzt dem Brei 1 ccm verd. Essigsäure (1 : 10) zu und filtriert. Im Filtrat darf ein Tropfen verd. Essigsäure keine neue Fällung hervorrufen, anderenfalls wird mehr Säure hinzugefügt und nochmals filtriert (G. Purlot, Journ. d. Pharm. d'Anvers, 1911, S. 165). Die Lösung ist kurze Zeit haltbar.

Das Emulsin soll im Gewebe von dem zu spaltenden Glykoside getrennt in bestimmten Zellen (Enzymzellen) lokalisiert[3]) sein. Die Enzymzellen fallen durch ihren lichtbrechenden und dichten Inhalt auf und führen das Emulsin mit dem Plasma-Eiweiß gemengt, doch gibt Spatzier an, daß im Samen der Amygdalaceen kleine Emulsinkörner vorkommen, die wie einschlußfreie Aleuronkörner aussehen und stark lichtbrechend sind. Die mikrochemischen Reaktionen sind unsicher und nur Gruppen- und Eiweißreaktionen. Guignard[4]) gebrauchte

[1]) Anm. b. d. Korr.: In neuester Zeit hat Grüss eine zusammenfassende Darstellung seiner Untersuchungen gegeben: Biologie und Kapillaranalyse der Enzyme, Gebr. Borntraeger, Berlin, Oktober 1912.

[2]) M. Raciborski, Über die extrazellulare Oxydase, Bull. de l'Ac. d. sc. de Cracovie, Math. nat. Kl., 1905, S. 668.

[3]) W. Johannsen, Sur la localisation de l'émulsine dans les amandes, Ann. d. sc. nat. Bot., 1887, 7. sér. VI, S. 118.

[4]) L. Guignard, Sur la localisation dans les plantes des principes, qui fournissent l'acide cyanhydrique, Compt. rend., 1890, CX, S. 477, ferner: L. Lutz, Bull. soc. bot., 1897, XLIV, S. 26.

Kupfersulfat-Kalilauge (S. 411), der Inhalt der Enzymzellen wird rotviolett, das übrige Gewebe kaum oder doch nur schwach rötlich, sowie Millons Reagens, welches beim Erwärmen tief orangerot färbt, während das benachbarte Gewebe nur schwach rosarot erscheint (Eiweiß); die Enzymzellen geben ferner die Guajakreaktion (Spatzier).

Wenig besagen die Reaktionen mit Orcinsalzsäure (Guignard, die jetzt im Handel befindlichen Emulsinpräparate geben keine Reaktion), bei der erwärmt werden muß, und mit Vanillinsalzsäure, die auch ohne Erwärmung eine violettblaue Färbung gibt. Jodjodkalium ruft in den Enzymzellen Bildung dunkelbrauner Ballen hervor, die fast das ganze Zelllumen ausfüllen (Prunus laurocerasus), während das Nachbargewebe nur auf Stärke reagiert. Man kann auch Vanillinsalzsäure mit Jodjodkalium vereinigen (Tunmann).

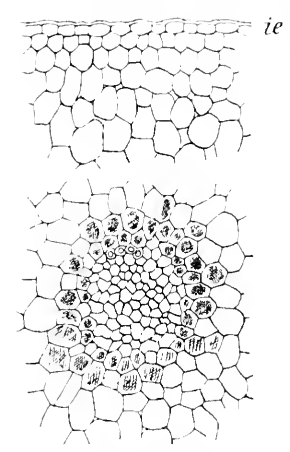


Fig. 101. Prunus amygdalus (Same, Keimblatt), Querschnitt mit Millon. Die sog. Enzymzellen sind schraffiert. *ie* = obere (innere) Epidermis (Tunmann).

Wie man sieht, sind die Reagentien nicht beweisend, sie sprechen nur für einen Eiweißgehalt bestimmter Zellen. Guignard hält diese Zellen für Enzymzellen. Nach ihm soll das Emulsin in der Mandel nur im Pericykel der Procambialstränge und im Blatte von Prunus laurocerasus in den Nerven in einer die Bündel umgebenden großzelligen Scheide lokalisiert sein (während die Glykoside nur im Blattmesophyll und Parenchym auftreten). Die Verhältnisse liegen jedenfalls nicht so einfach. Bei wiederholten Reaktionen habe ich bei Amygdalus in der Mehrzahl die in Fig. 101 angegebene Lokalisation erhalten, in einigen Fällen blieben die Reaktionen aber im Pericykel völlig aus. Bei Pr. laurocerasus traten die Reaktionen stets in der Bündelscheide ein, wie Guignard angibt, doch außerdem in zerstreut liegenden Nervenparenchymzellen und in zahlreichen, oft sogar in allen Zellen des Schwammparenchyms.

Guignard greift zum Beweise, daß nur die Zellen der Scheide Emulsin führen, zum Experiment, trennt die emulsinhaltigen Gewebe von den seiner Ansicht nach enzymfreien. Erwärmt man Schnitte durch die Lamina (Pr. laurocerasus), die keine Bündel enthalten, auf dem Objektträger in etwas Wasser, so soll kein Geruch wahrnehmbar sein, fügt man zu dem Objekte einige Schnitte durch den Hauptnerven hinzu und erwärmt nochmals, so soll sofort ein Geruch nach Blausäure auftreten. Nun habe ich von Amygdalus (amar.) nach Entfernung der

Samenschale sorgfältige zarte Oberflächenschnitte gemacht, die, da sie bündelfrei sind, kein Emulsin enthalten sollen. Beim Erwärmen der Schnitte auf dem Objektträger war aber stets ein Blausäuregeruch wahrnehmbar! Die Lokalisation des Emulsins ist somit nicht geklärt. Eingehende Nachprüfungen sind erforderlich. Vielleicht zeichnen sich die in Rede stehenden Zellen nur durch einen besonders hohen Gehalt an Emusin aus, das aber außerdem auch im Plasma der Glykosidzellen, wenn auch in geringerer Menge, auftritt.

Myrosin spaltet die Senfölglykoside (S. 392): es bildet ein weißliches, amorphes, zum Teil in Wasser lösliches Pulver. Für mikrochemische Zwecke genügt auch eine nicht gereinigte Myrosinlösung. Man verreibt die Samenflügel von Lunaria biennis (Guignard)[1]) zu Pulver, rührt dieses mit etwa dem 3—5-fachen Vol. Wasser an, läßt den Brei einen Tag stehen und benutzt die (falls nötig, filtrierte) Lösung, in der die Objekte bei 40—50° 20—30 Minuten belassen werden. Bei 60° wird die Myrosinlösung unwirksam. Ein reines Präparat in Pulverform, das man bei Gebrauch in Wasser löst, läßt sich aus den Samen von Brassica nigra gewinnen. Gepulverte Samen werden (Hartwich u. Vuillemin) mit dem 5fachen Vol. Wasser angerührt; der Brei bleibt einen Tag stehen, wird dann abfiltriert und abgepreßt. Die Flüssigkeit wird mit dem 5fachen Vol. 90% Alkohol versetzt. Es scheidet sich ein flockiger Niederschlag aus, der in Wasser gelöst und wiederum mit Alkohol gefällt wird. Der Niederschlag wird gesammelt, mit Alkohol ausgewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Myrosine kommen in besonderen Zellen vor. Die Verteilung dieser Idioblasten im Gewebe benutzte Schweidler[2]) zur Einteilung der Cruciferen. Man unterscheidet: 1. Exo-Idioblasten, im Mesophyll lokalisiert, Chlorophyll führend. Die Chlorophyllkörner sind aber klein und nicht intensiv gefärbt, daher in dem stark lichtbrechenden Inhalt leicht zu übersehen. 2. Endo-Idioblasten, chlorophyllfrei, meist prosenchymatisch, die Leitbündel begleitend. 3. Hetero-Idioblasten, Pflanzen mit Mesophyll- und Leitbündel-Idioblasten. Die Myrosine sind nicht auf die Cruciferen beschränkt; wahrscheinlich finden sie sich überall dort, wo Senfölglykoside vorkommen. Wir hätten Myrosine nicht nur in Capparidaceen, Cruciferen, Resedaceen, Tropaeolaceen, Limnanthaceen, sondern auch in Carica Papaya und Moringa (Guignard), im Violasamen (Spatzier), in Leguminosensamen (Bokorny), in der Rinde von Scorodophloeus Zenkeri (Leguminosen, Hartwich), in Umbelliferenwurzeln, Zwiebeln von Alliumarten und nach Muschler in Coronopus-Arten, C. niloticus (Leptom der Wurzeln), C. integrifolius (primäre Wurzelrinde), C. verrucarius (Pericykel der Zweige).

Die Myrosinzellen sind chlorophyllfrei oder doch arm an Chlorophyll, in Wurzeln stärkefrei oder doch stärkearm; in Gestalt und Größe sind sie teils von den benachbarten Zellen nicht zu unterscheiden, teils

[1]) L. Guignard, Rech. s. l. localisation des principes actifs des Crucifères, Journ. de Bot., 1890, IV, S. 435.

[2]) J. H. Schweidler, Die systematische Bedeutung der Eiweiß- oder Myrosinzellen der Cruciferen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 274.

treten sie als langgestreckte (Eiweißschläuche) oder sternartige Elemente auf (Schwammparenchym der Blätter). Im Stengel sind sie im Pericykel, doch auch in primärer Rinde und sekundärem Phloem, im Blatte im Schwammparenchym, Nervenparenchym, seltener im Palisadengewebe, in der Wurzel in der Rinde (Hypodermis und Pericykel), in Knollenwurzeln auch im Xylem und Phloem, im Samen in Radikula und Kotyledonen. Nach Guignard ist die Verteilung in den vegetativen Teilen und im Samen eine analoge. Wo sie in Rinde und Mark des Stengels und im Blattparenchym auftreten, finden sie sich auch im Parenchym der Kotyledonen und der Radikula. Meist sind Enzym und Glykosid im Embryo enthalten. Bei Lunaria, Matthiola u. a. ist das Enzym fast nur in der Samenschale, das Glykosid im Embryo.

An, lebend mit absolutem Alkohol fixiertem Material fallen an dünnen Präparaten die Myrosinzellen durch ihren geronnenen Inhalt auf, an Herbarmaterial als homogene, farblose, frei im Zelllumen liegende Klumpen oder die Zelle ausfüllende Massen, an Samen als kleinkörnige Gebilde. Im allgemeinen kann man sagen, daß das Myrosin in den vegetativen Teilen der Pflanze meist in gelöster Form als wasserhelle Substanz auftritt. Das gelöste Myrosin koaguliert in warmem Wasser (60°) schon nach wenigen Minuten; Alkohol und verd. Säuren bringen es zum Gerinnen. Konz. Schwefelsäure färbt bei gelindem Erwärmen purpurrot. Spatzier gibt noch zwei weitere Reaktionen an. Eine verd. Lösung von p-Diazobenzolsulfosäure (frisch bereitet durch Eingießen eines Gemisches von sulfanilsaurem Natron und Kaliumnitrit in verd. Schwefelsäure) färbt orangegelb. Eine Lösung von Indigo in Schwefelsäure, die durch sehr wenig Salpetersäure in Isatin übergeführt ist, färbt braunrot. Pepsinsalzsäure löst, aber erst nach längerer Zeit. In den Samen findet sich das Enzym in Gestalt kleiner, farbloser, stark lichtbrechender Körnchen, welche kleinen einschlußfreien Aleuronkörnern ähnlich sind und sich weder in Alkohol, Äther, Öl, noch (im Gegensatz zu den Aleuronkörnern) in verd. Essigsäure lösen. Sie lösen sich aber sehr leicht in Wasser.

Um sich über die Verteilung der Myrosinzellen zu unterrichten, benutzt man bei Zweigen und Wurzeln tangentiale Längsschnitte, bei Blättern Flächenschnitte. Dünnere Blätter lassen sich auch in toto verwenden, wenn man frisches Material durch längeres Einlegen in absoluten Alkohol entfärbt (und fixiert) hat und mit Millons Reagens prüft. In neuerer Zeit fixierte Schweidler[1]) Arabis mit Alkohol und färbte mit Säurefuchsin und Kernschwarz.

[1]) J. H. Schweidler, Die Eiweiß- oder Myrosinzellen der Gattung Arabis L., Beih., Bot. Centralbl., 1910, XXVI, S. 422.

Die besten Erfolge gibt Millons Reagens[1]. Die Schnitte werden direkt in das Reagens eingetragen und gelinde erwärmt. Schnitte aus Alkoholmaterial, die vorzuziehen sind, werden zuvor mit stark verd. Salpetersäure (1 : 100) befeuchtet. Der Inhalt der Myrosinzellen wird schnell orange, dann körnig leuchtend rot. Die Rotfärbung hebt sich scharf von dem Hellrot oder Rosa der benachbarten Zellen (Eiweißreaktion) ab. Bei Samen (Brassica) wird man die Präparate zuvor mit Äther oder Chloroform entfetten und die Aleuronkörner ev. mit verd. Essigsäure entfernen. Zu beachten ist schließlich, daß bei Objekten, die Sinalbin führen, dieses gleichfalls in Reaktion tritt und Rotfärbung gibt (Hartwich). In solchen Fällen (Samen, Sinapis alba) muß das Glykosid entfernt werden. Die Entfernung gelingt nur zum Teil durch Behandeln der Präparate mit kochendem Alkohol. Schnitte, die monatelang in absolutem Alkohol gelegen haben, vertragen ein kurzes Auswaschen mit Wasser, ohne daß das koagulierte Myrosin in Lösung geht.

Als Hilfsreaktion läßt sich konz. Salzsäure anwenden. Guignard[2] wollte die Salzsäurereaktion verbessern und gebrauchte Orcinsalzsäure (1 ccm Salzsäure + 1 Tropfen 10 % wässerige Orcinlösung) und Spatzier Orceinsalzsäure. Eine Lösung von gereinigtem Myrosin gibt mit Orcinsalzsäure aber keine Reaktion. Die Reaktion (Rotfärbung) wird ausschließlich durch die Salzsäure allein bedingt. Sie tritt beim Erwärmen sofort ein, in der Kälte erst nach einiger Zeit, ist aber dann besser lokalisiert. Bei mit Stärke erfüllten Winterwurzeln des Meerrettich habe ich mit Salzsäure (mit und ohne Orcinzusatz) keine Reaktion erhalten (s. auch S. 432). Weitere Hilfsreaktionen sind (Spatzier): Jodreagentien (Jodwasser, Chlorzinkjod, Jodchloral, goldgelbe Färbungen), Cochenilletinktur (violett), Naphthylenblau (blauviolett), Kalilauge (goldgelb).

Myrosinreiche Präparate zeichnen sich in vielen Fällen durch ihren Gehalt an Phosphorsäure aus (Dentaria, s. S. 94, auch in Cochlearia arm.). — Über die Lokalisation des Myrosins in Moringa hat F. Jadin Angaben gemacht (Compt rend., Apoth. Ztg., 1900, XV, S. 771).

Primeverase[3]) spaltet die Ölglykoside der Primulaceen und Ericaceen[4])

[1]) E. Heinricher, Eiweißschläuche d. Cruciferen u. verwandte Elemente in d. Rhoeadineenreihe, Mitt. Grazer bot. Inst., 1886. — W. Spatzier, Auftreten u. d. phys. Bedeut. d. Myrosins in der Pflanze, Jahrb. f. wiss. Bot., 1893, XXV, S. 56. — C. Hartwich u. A. Vuillemin, Beitr. z. Kenntn. d. Senfsamen, Apoth. Ztg., 1905, XVIII, Sep. S. 22. — R. Muschler, Monogr. d. Gatt. Coronopus. Englers bot. Jahrb., 1908, XLI, S. 112.

[2]) L. Guignard, Sur la localisation des principes, qui fournissent les essences sulfurées des Crucifères, Compt. rend., 1890, CXI, S. 920.

[3]) Goris et Ducher., Sur le mode de production de l'essence dans les racines de Primula officinalis Jacq., Bull. sc. pharm., 1906, XIII, S. 536.

[4]) Bei der Spaltung entstehen neben den Zuckern Öle, welche Ester der Salicylsäure und von Oxysalicylsäuren führen.

und ist wahrscheinlich identisch mit der Betulase von Gaultheria procumbens, Betula lenta und Monotropa hypopytis. Zur Darstellung eines enzymreichen Pulvers eignen sich am besten die getrockneten Kelchblätter von Primula off. (sie werden mit 80 % Alkohol und mit Äther behandelt [zur Entfernung der Glykoside und des Öles], dann getrocknet und gepulvert. Das mit Wasser verriebene Pulver darf keinen Anisgeruch entwickeln)[1].

In Primula officinalis hat Goris die Lokalisation der Primeverase ermittelt. „Die Schnitte werden auf ein Uhrglas gebracht und dort mit einigen Tropfen Millonscher Lösung übergossen. Man erwärmt dann gelinde und nimmt die Präparate aus der Flüssigkeit heraus, sobald sie sich gleichmäßig rosa gefärbt haben. Zum Schluß legt man sie in Glyzerin.“ Die Enzymzellen führen gleichzeitig Gerbstoffe: sie reagieren mit „Kaliumbichromat mit 1/5 Ferrosulfat oder sehr verd. Eisenchloridlösung bezw. 1 % Kupferazetatlösung.“ Auch nach mehrwöchentlicher Behandlung mit Alkohol (zur Entfernung der Gerbstoffe) färben sich die Enzymzellen mit Millon ziegelrot. Eine Freipräparation der Enzymzellen gelingt wegen der geringen Größe der Elemente nicht.

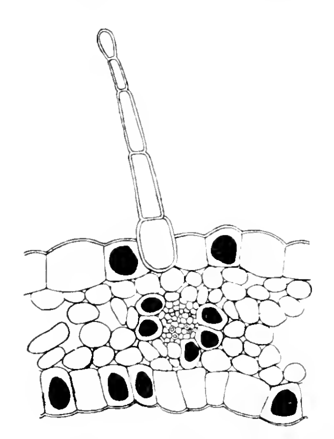


Fig. 102. Primula off. (Kelchblatt. Querschnitt), die sog. Enzymzellen sind schwarz eingezeichnet (nach A. Goris).

Die Enzymzellen finden sich in allen Teilen der Pflanze: in der Wurzel im Zentralzylinder, nicht im Rindenparenchym (damit stimmt überein, daß man die Wurzel zur Entwicklung des charakteristischen Geruches [zur Spaltung der Glykoside] zerquetschen muß, „ein einfaches Zerreiben genügt nicht“), im Blatt und Blattstiel, Blütenschaft und Blütenstiel „vorwiegend in der Umgebung der Bast-, Holz-, Gefäßbündel“, in Kelch- und Blumenblättern außerdem noch in der Epidermis (Fig. 102). Die Ölglykoside, Primeverin und Primulaverin, sind jedenfalls gleichmäßig im Parenchym verteilt. Ihr Nachweis gelingt aber nur schlecht (nach Guignard, S. 393 unt.).

Proteolytische Enzyme.

Zum Nachweis peptolytischer Enzyme (in den Kannen von Nepenthes u. a.) würde sich wahrscheinlich die Methode von Abderhalden und Schittenhelm[2]) mikrochemisch (auch in Präparaten) verwenden lassen.

---

[1]) A. Goris, M. Mascré et Ch. Vischniac, Étude des essences de Primevère, Roure-Bertrand fils, Berichte 1912, II, S. 3.

[2]) E. Abderhalden u. A. Schittenhelm, Über den Nachweis peptolytischer Fermente, Ztschr. f. phys. Chem., 1909, LXI, S. 421.

Es gelangen hierbei leicht lösliche Polypeptide zur Anwendung, die größere Mengen schwer löslicher und leicht kristallisierbarer Aminosäuren enthalten. Die eingetretene Spaltung wird an den ausgeschiedenen Kristallen erkannt. Benutzt wird eine klare, 10—15%, von Hoffmann-La Roche (Basel) zu beziehende Lösung, die mit Natriumkarbonat ganz schwach alkalisch gemacht ist. Sie wird mit der Enzymlösung und etwas Toluol versetzt und in den Brutschrank gebracht. Bei Gegenwart von peptolytischen Enzymen werden sich Tyrosinkristalle bilden. Später hat Abderhalden[1]) eine 10%ige Glycyl-l-tryptophanlösung benutzt, aus der peptolytische Enzyme Tryptophan abspalten, welches mit Brom eine violette Farbenreaktion gibt. Die Schnitte kommen in die Lösung, die mit Toluol überschichtet wird, werden nach 12 bis 48 Stunden herausgenommen, abgespült und Bromdämpfen ausgesetzt. In vielen Fällen zeigte die nun eintretende Violettfärbung, die gut lokalisiert war, den Sitz der Enzyme an (besonders werden die Gefäße gefärbt!).

Fermi und Buscalioni[2]) haben proteolytische Enzyme in Phanerogamen und in einigen Mykorrhizen nachzuweisen gesucht, indem sie die betreffenden Schnitte auf eine karbolsäurehaltige Gelatineplatte brachten. Verflüssigung derselben wurde auf die Gegenwart proteolytischer Enzyme gedeutet.

Shibata[3]) wählte makrochemische Methoden. Die abgetrennten Mykorrhizen wurden mit destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet, mit Glyzerin verrieben. Der Glyzerinbrei blieb eine Woche in verschlossenem Glaskolben unter öfterem Umrühren stehen, wurde dann durch Leinwand filtriert und mit dem 1—3fachen Volumen destillierten Wassers versetzt. In diese mit 0.05—0.1% Salzsäure angesäuerte Flüssigkeit wurden kleine Fibrinstückchen gebracht. Die so beschickten Flüssigkeiten wurden auf 4—5 Stunden, auch länger, im Thermostaten gehalten und die Lösung der Fibrinstücke festgestellt.

Die Proteasen des Zellsaftes können nach der Chromogramm-Methode von Grüss nachgewiesen werden. Hierzu benutzt man ein mit Albumose durchtränktes Filtrierpapier, „laugt nach der Kapillarisation die Peptone aus und bringt das restierende Eiweiß durch Färbung zum Vorschein“.

---

[1]) E. Abderhalden, Notiz zum Nachweis peptolytischer Fermente in Tier- und Pflanzengeweben, Ztschr. f. phys. Chem., 1910, LXVI, S. 137.

[2]) C. Fermi u. L. Buscalioni, Die proteolytischen Enzyme im Pflanzenreiche, Centralbl. f. Bakter., 1899, V, 2. Abt.

[3]) K. Shibata, Cytologische Studien über die endotrophen Mykorrhizen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1902, XXVII, S. 670.

Reduzierende Enzyme.

In Kürze sei auf den Nachweis der Reduktasen von Palladin[1]) hingewiesen. Weizenkeimlinge werden in kleinen Gläsern mit einigen Tropfen Chloroform versetzt, dann mit einer leicht reduzierbaren Farblösung übergossen (Methylenblau, Indigo, Hämatoxylin) und die Gläser luftdicht verschlossen. Die Lösungen sind nach 2 Tagen völlig entfärbt, nehmen aber beim Stehen an der Luft ihre Farbe wieder an. Ob diese Methoden sich auf Schnitte übertragen lassen, muß erst erprobt werden. Vor allem wäre auf einen vollständigen Abschluß der Luft zu achten, der sich schon bei makrochemischen Arbeiten schwierig gestaltet. Bei letzteren genügt (bei Milchuntersuchungen) flüssiges Paraffin nicht, am besten eignet sich ein dicht schließender Kautschukstopfen in Verbindung mit einem Wattepfropfen, der mit Pyrogallolkalium getränkt ist. Dieser Verschluß wird auch bei Keimpflanzen am besten sein.

Urtica-Enzym.

Das giftige Sekret der Brennhaare von Urtica dioica hält Haberlandt[2]) für eine Substanz, „welche sich in bezug auf manche Eigenschaften den ungeformten Fermenten oder Enzymen anschließt“. Ein Alkaloid soll nicht vorliegen, da der Körper „gleich einem Enzym durch Alkohol fällbar und in Wasser neuerdings löslich ist“. Werden die Trichome 10—20 Sekunden in kochendes Wasser getaucht, dann ist der Zellsaft feinkörnig koaguliert, opak, weißlich und gibt Eiweißreaktion (Millon, Raspail). An Herbstmaterial ruft Schwefelsäure eine rote Färbung hervor. Der Saft gibt mit Kupfersulfat und Bleiazetat einen gelbbraunen Niederschlag, Salpetersäure färbt gelb, Jodtinktur gelbbraun.

III. Der Protoplast.

Protoplasma.

Das Protoplasma der Zelle besitzt die Fähigkeit der Reizbarkeit, der Kontraktilität, der Nahrungsaufnahme, des Wachstums usw., kurz. Protoplasma ist ein biologischer Begriff. Es besteht aus einer sehr zähen Emulsion (Cytoplasma, Plasma) und halbflüssigen (bis festen?) Anteilen. In der jugendlichen Zelle erfüllt das Cytoplasma völlig das Zelllumen, bald treten größere mit wässerigem Safte (Zellsaft) erfüllte Räume (Vakuolen) auf (Fig. 103). Die Vakuolen ver-

[1]) W. Palladin, Die Atmungspigmente der Pflanzen, Ztschr. f. phys. Chem., 1908, LV, S. 207.

[2]) G. Haberlandt, Beiträge zur Anatomie und Physiologie der pflanzlichen Brennhaare, Sitzber. Wien. Akad., 1886, XCIII, 1. Abt., S. 223.

einigen sich meist bei endgültiger Ausbildung der Zelle zu einem großen Saftraum. Das Plasma bildet schließlich nur einen zarten Belag, der der Zellwand anliegt (Primordialschlauch). Der Plasmaschlauch ist dann schwer zu erkennen und muß durch Färbung und Plasmolyse (s. d.) oder durch Schwefelsäure (s. Zellulose) sichtbar gemacht werden. Vielfach, besonders bei mechanischen Elementen, wird das Plasma völlig oder doch nahezu vollständig verbraucht.

Dem Zellsaft kommt in der Mikrochemie eine große Bedeutung zu, da in ihm die verschiedensten anorganischen und organischen Stoffe (Pflanzensäuren, Polysaccharide, Glykoside, Alkaloide) gelöst sind. Er ist entweder farblos und durchscheinend klar oder mehr oder weniger stark gefärbt. Durch konz. Lösungen kann der Zellsaft trüb und dickflüssig werden.

Das Cytoplasma wird außen von einer hyalinen Haut abgegrenzt (Plasmahaut, Hyaloplasma); die Schicht, welche die Vakuolen umgibt, ist ebenfalls hyalin (innere Plasmahaut, Tonoplast). Man unterscheidet: Kinoplasma, das sich bei der Kern- und Zellteilung beteiligt (Hautschicht, Spindelfasern, Centrosomen, Plasmastrahlungen, Cilien, Kernwand, Zellplatte), es wird, mit Flemming fixiert und dem Dreifarbengemisch (s. Kern) gefärbt, blauviolett; Trophoplasma (Nährplasma, hierher zählen auch die Vakuolenwände) führt die für das Leben so wichtigen metaplasmatischen Einschlüsse (Chondriosamen [s. d.], Mikrosomen, teils feste Gebilde, teils kleine Bläschen oder Physoden); es wird nach Fixierung mit Flemming mit dem Dreifarbengemisch braun.



Fig. 103. Pelargonium roseum (jugendliche Drüse), die Sezernierungszelle mit Cytoplasma angefüllt, in d. Stielzellen Vakuolenbildung (Tunmann).

Die Struktur des Cytoplasmas hat zu verschiedenen Theorien geführt (Granula-, Fadengerüst-Theorie u. a.). Die meisten Anhänger hat die Wabentheorie (O. Bütschli), die dem Plasma einen wabigen Aufbau zuschreibt. Die Waben lassen sich aber auch künstlich erzeugen (A. Degen, Bot. Ztg., 1905, LXIII, 163). Wabenbildner sind 0.01—0.02 % Laugen, 0.05 bis 0.1 % Alkalikarbonate. Die Waben treten nach dem Auswaschen der Alkalien mit Wasser scharf hervor und lassen sich fixieren (Osmiums., wässeriges Sublimat, Formaldehyd). Wahrscheinlich ist das lebende Plasma eine kolloidale Lösung emulsionsartiger Natur, die unter gewissen Bedingungen „in gallertartigen Schaum mit flüssigen Wabenwänden übergehen kann“ (W. Lepeschkin, Ber. deutsch. bot. Ges., 1911, XXIX, 188). So gibt dicke Schmierseifenlösung mit Xylol geschüttelt einen beständigen Schaum gallertartiger Natur. Die Waben sind mit Xylol erfüllt, die Wabenwände bestehen aus Seifenlösung.

Ultramikroskopisch erscheint das Plasma weiß, auch blau; die blaue Farbe ist eine Folge der Beugungserscheinung (N. Gaidukov, Ber. bot. Ges. 1906, XXIV, S. 110). Das Plasma ist meist farblos (bei Thioploca schwach bläulich), mischt sich nicht mit Wasser und da es

stärker lichtbrechend als dieses ist, so sind im gewöhnlichen Lichte selbst feine Plasmastränge noch gut zu erkennen. Die Chemie des Plasmas ist nicht aufgeklärt. Wir wissen nur, daß es kein einheitlicher chemischer Körper ist, sondern aus einer ganzen Anzahl verschiedener Substanzen besteht und in steter Veränderung begriffen ist. Mit wenigen Ausnahmen (S. 409) sind im Plasma Eiweißkörper zugegen. Mikrochemisch wird der Nachweis von Eiweiß zur Feststellung von Plasma meist genügen. Auch der Plastinnachweis kann geführt werden. „Das Zellprotoplasma" sagt Zacharias (Lit. S. 418, 2) „quillt in verd. Salzsäure, nicht aber in Glaubersalzlösungen. Es färbt sich in Essigkarmin verschwommen, schwach oder gar nicht. Nach der Behandlung mit verd. Salzsäure färbt es sich rot in Methylenblau-Fuchsin S. In Magensaft quillt das Zellplasma, bleibt aber im wesentlichen ungelöst. Die Verdauungsrückstände erscheinen in verd. Salzsäure blaß und glanzlos, quellen nicht in Salzsäure von höherer Konzentration, färben sich hellrosa bis rot in Methylenblau-Fuchsin S, quellen oder lösen sich in Sodalösungen verschiedener Konzentration und werden von 0,5% Kalilauge gelöst".

Über **interzellulares** Plasma ist mehrfach berichtet worden. Hierzu gaben Veranlassung die mit Jod mehr oder weniger reagierenden Massen und Bildungen, welche die Interzellularräume auskleiden. Russow[1]), Berthold[2]), Schaarschmidt u. a. traten für interzellulares Plasma ein, Frank (Pflanzenphys., S. 154) sprach von einer „inneren Cuticula", Gardiner[3]), Schenck[4]), Buscalioni[5]) brachten die Bildungen mit Produkten der Mittellamelle in Verbindung. Mattirolo und Buscalioni benutzten bei Lycopus künstlichen Magensaft. Die Auskleidungen entstehen durch Spaltung der Mittellamelle, die eine chemische Metamorphose erleidet: sie färben sich mit Chlorzinkjod nur schwach und sind in Schwefelsäure löslich. Abweichend scheint es sich mit den Befunden von Kny[6]) zu verhalten, der interzellulares Plasma für die Kotyledonen der Leguminosensamen (Pisum,

[1]) E. Russow, Über den Zusammenhang der Protoplasmakörper benachbarter Zellen, Sitzber. Dorpat. Naturf. Ges., 1883, VI, 562 u. 1882, V, 350.

[2]) G. Berthold, Über das Vorkommen von Protoplasma in Interzellularräumen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1884, II, S. 20.

[3]) W. Gardiner, The Continuity of Protoplasm in Plant-Tissue, Nature, 1885, S. 390.

[4]) H. Schenck, Über die Auskleidung d. Interzellulargänge, Ber. deutsch. bot. Ges., 1885, III, S. 217.

[5]) L. Buscalioni, Malpighia, 1889, III, S. 143.

[6]) L. Kny, Studien über interzellulares Protoplasma, Ber. deutsch. bot. Ges., 1904, XXII, S. 29 u. 347.

Lupinus u. a.) angibt. Die Keimblätter sind von Interzellularen durchzogen, welche neben Gasen eine schleimige Füllmasse führen, die bei der Keimung verbraucht wird. Zur Untersuchung läßt man die Samen 24 Stunden in Wasser quellen. Die Aleuronkörner sind dann zerfallen, das Cytoplasma bildet eine körnige bräunliche Masse. In den Interzellularen sind die, die Beobachtung störenden Gase entwichen, die Füllmasse ist nun deutlich sichtbar und gleicht dem Cytoplasma: organisierte Gebilde fehlen. Zellplasma und Interzellularplasma zeigten gleiche Eiweißreaktionen (Jodreagentien, Millons Reagens, Biuretreaktion u. a.) und gleiche Färbungen (Eosin, Fuchsin, Safranin, Anilinblau, Karmin u. a.). Von Verdauungsflüssigkeiten (Pepsin-Glyzerin Salzsäure), in welche die Schnitte teils direkt, teils nach 24stündiger Alkoholbehandlung gebracht wurden, wird das Interzellularplasma weit schneller gelöst als das Zellplasma und zwar vollständig. — In den interzellularen Sekretbehältern konnte Tunmann keine plasmatischen Substanzen nachweisen (Pharm. Ztg. 1907, LII, S. 353).

Extramembranöses Plasma[1]) soll bei Peridineen, Diatomeen und Desmidiaceen der Außenseite der Wandporen in Gestalt kleiner Knöpfchen vorgelagert sein und sich übereinstimmend mit dem Zellplasma intensiv mit Safranin und Hämatoxylin färben, während Membran und Gallerte ungefärbt bleiben. Karsten[2]) hält die Knöpfchen für Gallerttropfen.

Reaktion des Plasmas und des Zellsaftes.

Dem Plasma und seinen organisierten Bestandteilen kommt eine alkalische Reaktion zu, während der Zellsaft überwiegend sauer reagiert. In vielen Fällen führt der Zellsaft Anthocyane (S. 342), dann kann man aus der Farbe auf die Reaktion schließen (rot = sauer, blau = neutral oder schwach alkalisch, grüngelb = stark alkalisch). Im Laufe der Vegetation ändert sich zuweilen die Reaktion des farbigen Zellsaftes, womit ein Umschlag der Färbung verbunden ist. Daß die verschiedenen Färbungen die Reaktionen des Zellsaftes anzeigen, bewies Pfeffer (Osmot. Unt., 1877, S. 140, Pulmonaria off., Tradescantia). Der rote (saure) Zellsaft nimmt durch Spuren von Ammoniak eine blaue Färbung an, die durch äußerst verd. Salz- oder Schwefelsäure wieder in Rot zurückgeführt werden kann und zwar ohne das Leben der Zellen zu schädigen.

Ganz überwiegend ist der Zellsaft farblos und um dessen Reaktion zu ermitteln, wendet man Farbstoffe als Indikatoren an. Die Farbstoffe gelangen in möglichster Verdünnung zur Anwendung, nur die

[1]) F. Schütt, Jahrb. f. wiss. Bot., 1899, XXXIII, S. 594 u. 1900, XXXV, S. 470.
[2]) G. Karsten, Ref. d. Arb. v. Schütt, Bot. Ztg., 1899, LVII_2, S. 330.

Reaktion an lebenden Zellen gestattet zuverlässige Schlüsse. Die Indikatoren dürfen die lebende Zelle nicht schädigen und müssen selbst in großer Verdünnung einen scharfen Farbenumschlag erkennen lassen. Fr. Schwarz benutzte den Farbstoff des Braunkohls (Brassica oleracea var. crispa Garcke). Die farbstoffführende Epidermis der Blattstiele wird abgezogen und mit warmem Wasser (45—55°) extrahiert, die Lösung wird abfiltriert, das Filtrat durch Aufkochen vom Eiweiß getrennt und der nochmals filtrierte Indikator durch etwas Salizylsäure haltbar gemacht. Dieser Indikator zeigt folgende Farbenreaktionen: ziegelrot (stark sauer), purpurrot (sauer), rotviolett (schwach sauer), violett (neutral)[1], blau bis blaugrün (schwach alkalisch), grasgrün (stärker alkalisch), gelblich (sehr stark alkalisch). Der Farbstoff der Radieschen, der zu makrochemischen Zwecken wiederholt als Indikator empfohlen wurde (Sacher, Chem. Ztg. 1910, XXXIV, 1333), wäre in wässeriger Lösung ebenfalls zu versuchen. Pfeffer[2]) benutzte künstliche Farbstoffe in wässeriger Lösung (0.01 %), so Cyanin (Blaufärbung zeigt die alkalische Reaktion des Plasmas an), Tropaeolin, Corallin, Methylorange.

Die Methoden lassen sich auch zur Ermittelung der Reaktion einzelner Bestandteile des Plasmas anwenden. Mit dem Kohlfarbstoff werden am stärksten die Zellkerne gebläut (sowohl die Nukleolen und das Chromatin als auch das Gerüst), im Cytoplasma treten die Mikrosomen besonders kräftig gefärbt hervor[3]). Chloro- und Leukoplasten besitzen ebenfalls alkalische Reaktion. Die saure Reaktion des Zellsaftes ist auf die Gegenwart der meist auftretenden Pflanzensäuren zurückzuführen.

Lebendfällung.

Fällungen in der lebenden Zelle (Lebendfällung) lassen sich, wie schon Ch. Darwin (Insektenfr. Pfl., 1876, S. 34, 58) mitteilte, durch stark verd. wässerige Lösungen von Alkaloiden und anderen basischen Substanzen hervorrufen (Alkalikarbonate, s. S. 257 ob., besonders Ammoniumkarbonat, de Vries, Bot. Ztg., 1886, XLIV, 1. Ammoniumnitrat ist ungeeignet, Czapek, Lit. S. 166, 1). Lebendfällung erfolgt auch bei der Plasmolyse (4 % Rohrzucker, Salpeter, Chlorkalzium, W. Pfeffer.

[1]) Fr. Schwarz, Morph. u. chem. Zusammens. des Protoplasmas, Cohns Beitr., 1887, V, 20 u.: A. Meyer, Kritik der Ansichten von Frank Schwarz üb. d. alkal. Reakt. d. Protoplasmas, Bot. Ztg., 1890, XLVIII 2, 234.

[2]) W. Pfeffer, Über Aufnahme von Anilinfarben in lebenden Zellen, Tübinger Arbeiten, 1886, II, S. 179.

[3]) Fr. Schwarz, Cohns Beitr. z. Biol. d. Pflanz., 1892, V, S. 12.

Lit. S. 442, 2). Bei nachträglichem Wasserzusatz verschwindet mit der Plasmolyse auch die Fällung.

Loew und Bokorny[1]) studierten seit 25 Jahren die Einwirkung basischer Verbindungen auf lebende Zellen und empfehlen in erster Linie Coffein (und Antipyrin) in 0.1—0.2% wässeriger Lösung. Es entstehen glänzende, rundliche Tröpfchen, die ineinander fließen und sich (im Gegensatz zu der Alkalifällung) mehrere Tage unverändert halten. van Wisselingh (Lit. S. 258, 4) hat bei Algen eine 1% wässerige Antipyrinlösung benutzt und nach Czapek lassen sich noch folgende Lösungen anwenden: Pyridinlösung (1 Mol : 8—100 Liter, myelinartige Tropfenniederschläge), Chinolinlösung (einige Tropfen Chinolin mit Wasser geschüttelt, wirkt ähnlich). Phenylhydrazinlösung (in 50% Alkohol gelöst, gelbbraune, amorphe, zackige Schollen), Chinin, Codein, Morphin und ihre Salze erzeugen dichte feintropfige Niederschläge. Diese Niederschläge entstehen nur in unbeschädigten, lebenden Zellen, bei Echeverien vorzüglich in den unter der Epidermis liegenden Mesophyllzellen. Die Reaktion gestattet somit eine Unterscheidung von lebendem und totem Plasma[2]). Die gefällten Tröpfchen wurden als **Proteosomen** bezeichnet. Ihre chemische Zusammensetzung ist trotz vieler Publikationen noch strittig.

Nach Loew und Bokorny[3]) soll Gerbstoff nicht vorliegen, da gerbsaures Coffein, im Gegensatz zu den Proteosomen, sich sehr leicht in Ammoniak auflöst. Die Proteosomen koagulieren bei 50—56°, sowie durch verd. Säuren oder durch verd. Alkohol von 10—20% und geben Eiweißreaktionen. Doch unterscheiden sie sich von dem gewöhnlichen Eiweiß dadurch, daß sie durch 0.1% Ammoniak in feste Kugeln umgewandelt werden, die bei Druck zerbrechen. Czapeks Ansicht von der Löslichkeit der Proteosomen in Alkohol soll auf Vortäuschung

---

[1]) Th. Bokorny, Einwirk. bas. Stoffe auf d. leb. Plasma, Jahrb. f. wiss. Bot., 1888, XIX, 206; Üb. Aggregation, Jahrb. f. wiss. Bot., 1889, XX, 427. — O. Loew u. Th. Bokorny, Z. Chem. d. Proteosomen, Flora, 1892, LXXVI, 117.

[2]) Hierzu hatten O. Loew und Th. Bokorny früher eine verd. alkalische Silberlösung benutzt, welche von lebendem, aber nicht von totem Plasma reduziert werden sollte (Lit. S. 413, 2). Dieser Nachweis wurde von verschiedenen Seiten abgelehnt (W. Pfeffer, Loew und Bokornys Silberredukt. in Pflanzenzell., Flora, 1889, LXXII, 46). Zur Unterscheidung von totem und lebendem Plasma dient Fuchsin. Totes Plasma speichert den Farbstoff begierig, lebendes nicht. Das Verfahren wird zur Unterscheidung von lebenden und toten Hefezellen benutzt: in einer 0.1% Fuchsinlösung erscheinen tote Hefezellen im mikroskopischen Bilde sofort stärker gefärbt als die Farblösung.

[3]) O. Loew u. Th. Bokorny, Aktives Eiweiß und Tannin in Pflanzenzellen, Flora 1911, CII, S. 113 u. Lit. S. 409, 2.

eines Lösungsvorganges durch starken Alkohol beruhen. Ihre Unlöslichkeit zeigt sich, wenn man die Objekte zuerst mit 20% Alkohol 3—4 Stunden behandelt, wobei sie koagulieren: nachher bleiben sie in starkem Alkohol ungelöst und unverändert. Auch verd. Essigsäure kann zur Koagulation benutzt werden. Die Präparate werden in 0.5% Coffeinlösung gelegt (Bildung von Proteosomen) und dann das betreffende Glasröhrchen („einige Minuten" bei Spirogyren, 10 Minuten bei Flächenschnitten von Echeveria) in. auf 60° erhitztes Wasser gebracht. Die Proteosomen koagulieren nun. Oder die Algen kommen in 0.5% Coffeinlösung, dann in 8% Essigsäure. die mit 4% Chlornatrium und 0.5% Coffein versetzt ist. Diese „Lösung wirkt sehr rasch auf die Proteosomen koagulierend". Gerbstoffe bleiben selbst nach mehrtägiger Coffeinbehandlung löslich, die Proteosomen werden fest (ähnlich wirkt Jod). Die Proteosomen können nur aus äußerst labilen Proteinstoffen bestehen. Hingegen macht Czapek geltend, daß sich die Coffeinfällung beim Einlegen der Präparate auf kurze Zeit in Azeton. Äthylalkohol, Methylalkohol auflöst und daß Myelinformen entstehen, die auf Fette hindeuten, zumal Fettfarbstoffe (Sudan III, Alkannin in Azeton gelöst) gespeichert werden. Doch sollen nach Czapek auch konz. Tanninlösungen Myelinformen geben. Außerdem soll möglicherweise ein schleimiges, in Alkohol unlösliches Kohlehydrat in Betracht kommen. P. Klemm (Flora, 1882, LXXV, 397 u. Lit. S. 384. 1), der in Übereinstimmung mit Klercker einen Eiweißgehalt verneint, gibt bei Azolla, Rosa, Quercus, Nymphaea u. a. Gerbstoffe und Fette an und, da er bei Crassulaceen Rotfärbung mit Vanillinsalzsäure erhielt, einen phloroglucidischen Körper. Die Reaktion mit Vanillinsalzsäure kann aber auch auf Eiweißkörper (S. 415), möglicherweise auf Enzyme (S. 432) hinweisen.

Lebendfärbung.

Die Aufnahme verschiedener Anilinfarben durch die lebende Zelle, die Lebendfärbung, wurde von Pfeffer (Lit. S. 442,2) und gleichzeitig an tierischen Objekten mit den gleichen Farbstoffen von Ehrlich[1]) studiert. Den Gründen, von denen die Farbstoffaufnahme abhängt, wird in neuester Zeit von den verschiedensten Seiten nachgeforscht. Da der gesamte Ein- und Austritt gelöster Substanzen in die lebende Zelle von der Plasmahaut abhängt und reguliert wird, so ist die Lebendfärbung von fundamentaler Bedeutung für die Erforschung der Plasmahaut, ihrer Permeabilität u. a.

[1]) P. Ehrlich, Über die Methylenreaktion der lebenden Nervensubstanz, D. med. Wchschr., 1886. Aus diesen Forschungen entwickelte sich die Farbentherapie, aus dieser in neuester Zeit die Chemotherapie, die großartige Erfolge in der Medizin zeitigte (P. Ehrlich, Aus Theorie u. Praxis d. Chemotherapie, Leipzig 1911).

Aus den ersten Versuchen ging hervor, daß nicht alle Farbstoffe zur Lebendfärbung geeignet sind. Ehrlich, der die Lebendfärbung auf chemische Ursachen zurückführte, hielt nur basische Farbstoffe für geeignet (Vitalfarben). Anderseits gelangte Overton (Lit. S. 229, 3) zu dem Ergebnis, daß sich Vitalfarben in Cholesterin und Lezithin leicht lösen (Lipoidlöslichkeit) und daß ganz allgemein ein Körper um so schneller in die Zellen eindringt, je mehr der Teilungskoeffizient „Löslichkeit in Fett durch Löslichkeit in Wasser" zugunsten des Fettes liegt. So ergab sich die Lehre von der Lipoidnatur der Plasmahaut, die durch Czapeks Untersuchungen in neuerer Zeit gestützt wird. Doch kann „von einem geschlossenen Fetthäutchen[1]) als äußere Hülle des Protoplasten nicht die Rede sein"[2]). Es kann sich „nur um eine äußerst feine Emulsion von Neutralfett handeln, deren Dispersionsmittel, das wohl als ein Eiweißsol anzusehen ist, für Wasser und wasserlösliche Stoffe gut permeabel ist". Lepeschkin[3]) betrachtet die Plasmamembran als eine kolloidale Lösung, die die Eigenschaften eines temporär flüssigen Niederschlages besitzt: „im Dispersionsmittel der Plasmamembran sind außer Wasser und Eiweißkörpern auch ölartige Körper vorhanden".

Anderseits konnte Ruhland[4]) an größeren Versuchsreihen zeigen, daß die basischen Farbstoffe aufgenommen werden, die Säure-Farbstoffe, speziell die der Sulfosäure, im allgemeinen aber nicht. „Die Schnelligkeit der Aufnahme ist unabhängig vom Grade der Lipoidlöslichkeit. So werden z. B. das sehr schwer lipoidlösliche Malachitgrün und das Thionin mit großer Schnelligkeit, das sehr leicht lösliche Rhodamin ungemein langsam aufgenommen." Küster[5]) fand, daß fettunlösliche Stoffe leicht in die Zellen eintreten. Nach Szücs[6]) ist die Permeabilität der Plasmahaut nicht konstant. Die Aufnahme basischer Stoffe wird durch bestimmte Elektrolyten verzögert, so bei

[1]) Quincke schrieb dem Protoplasten eine periphere Ölhaut zu (Ann. d. Chem. u. Phys. 1888, XXXV, 630). Nach A. Nathansohn (mehrere Arb. in Jahrb. f. wiss. Bot., XXXII, XL u. a.) ist die Plasmahaut ein Mosaik von lebenden Plasmateilchen und Lipoiden.

[2]) F. Czapek, Oberflächenspannung u. Lipoidgeh. d. Plasmahaut i. leb. Pflanzenz., Ber. d. bot. Ges., 1910, XXVIII, 480.

[3]) W. Lepeschkin, Plasmamembr., Ber. d. bot. Ges., 1910, XXVIII, 393; Chem. Zusammens. d. Plasmamembr., Ber. d. bot. Ges., 1911, XXIX, 247.

[4]) W. Ruhland, Permeab. d. Plasmahaut, Jahrb. wiss. Bot., 1909, XLVI, 1.

[5]) E. Küster, Über die Aufnahme von Anilinfarben in lebende Pflanzenzellen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1911, L, S. 261.

[6]) J. Szücs, Protoplasmapermeabilität, Anzeiger, Wien. Ak., 1910, XVIII, S. 285.

Gegenwart saurer Farbstoffe: dabei entstehen Farbstoffsalze, für die die Zellhäute impermeabel zu sein pflegen.

Zu den basischen Farbstoffen, die aufgenommen werden, zählen (nach Ruhland): Azofarbstoffe (Anilingelb, Chrysoidin, Bismarckbraun), Triphenylmethanfarbstoffe (Malachitgrün, Rosanilin und Pararosanilin nebst Salzen, Dahlia, Methylviolett, Methylgrün), Pyroninfarbstoffe (Rhodamin B), Oxazine (Nilblau, Prune pure), Thiazine (Gentianin, Methylenblau, Methylengrün, Thioninblau, Toluidinblau), Azine (Toluylenrot, Safranin, Nigrosin). „Vollviolett S", sagt Küster, „vermag vital in die Zellen von Ruta graveolens einzudringen: Chromgrün färbt die Zellen verschiedener Gewächse intra vitam. Mit den fluoreszierenden Pyroninfarbstoffen Eosin, Erythrosin und Echtsäurephoxin wurde an zahlreichen Pflanzen kräftige Vitalfärbung erzielt." Vollviolett S erscheint nach dem Eintritt an kleine Öltröpfchen gebunden. Indigkarmin färbt den Zellsaft nicht tiefblau, sondern nur zart blau oder fällt als Niederschlag aus. Bemerkenswert ist ferner, daß Säurefuchsin, Orange G, Naphthalingrün V u. a. eingetretene Farbstoffe durch Auswaschen in stehendem oder fließendem Wasser sich nicht mehr entfernen lassen.

Zur Lebendfärbung (Methode S. 257) dienen als Versuchsobjekte Algen, Epidermen von Allium cepa, submerse Wurzeln von, auf Wasser schwimmenden Pflanzen (Azolla, Lemna, Trianea bogot.). Zuerst wurden Methylenblau und Toluylenrot (Neutralrot) studiert. Pfeffer ließ Pflanzen einige Tage in einer Lösung von 1 Teil Methylenblau in 10 Millionen Teilen Wasser. Hierbei werden die Gerbstoffe gefällt. Methylenblau kann ohne Schädigung der Zellen durch 0.01 % Zitronensäure wieder entfernt werden. Man kann auch (Küster) die Farblösungen in den Leitbündeln emporsteigen lassen, wodurch viele Farbstoffe, besonders saure, in das angrenzende Parenchym eintreten. Transpiration fördert die vitale Farbstoffaufnahme.

Eine eingehende Darstellung des Gegenstandes würde an dieser Stelle zu weit führen; es muß auf die angeführten Quellen verwiesen werden, in denen die Spezialliteratur angeführt ist. Erwähnt sei nur, daß die jüngsten Befunde Ruhlands[1]) zu folgendem Satze führten: „Für die Aufnehmbarkeit sowohl der basischen wie der Säurefarbstoffe in die lebende Pflanzenzelle bietet nicht die Lipoidlöslichkeit, die Dialyse in Wasser, das Molargewicht oder die Anzahl der Benzolkerne, sondern die Beweglichkeit der Farbstoffteilchen in konzentrierten, d. h. engporigen Gelen einen genauen Maßstab." Die Plasmahaut wirkt als Ultrafilter im Sinne Bechholds (Ztschr. phys. Chemie, 1907, LX, S. 257).

[1]) W. Ruhland, Die Plasmahaut als Ultrafilter bei der Kolloidaufnahme, Ber. deutsch. bot. Ges., 1912, XXX, S. 139.

Plasmolyse.

Unter Plasmolyse versteht man die Kontraktion des lebenden Protoplasten unter dem Einfluß wasserentziehender Reagentien. Man benutzt vorteilhaft Lösungen neutraler Substanzen in einer Konzentration, daß das Leben des Protoplasmakörpers nicht leidet. (Wässerige Lösungen von Kalisalpeter [4%, ebenso wirkt Chlorkalium bei Allium und Beta, W. Wächter. Jahrb. f. wiss. Bot., 1905, XLI. 165]. Chlornatrium [5—10%], Rohrzucker [10—15%]. Glyzerin, Kaliumazetat u. a.). Versuchsobjekte sind Algenfäden, die Epidermen von Stengeln. Blättern. Zwiebelschuppen und Trichome. Der Plasmaschlauch zieht sich von der Membran allmählich zurück und erscheint als geschlossener Sack im Zelllumen. Bei farbstoffführenden Zellen tritt naturgemäß der Plasmaschlauch mit seinem farbigen Inhalt weit deutlicher hervor. da der Raum zwischen ihm und der Zellwand sich farblos abhebt. Aus diesem Grunde läßt man bei farblosen Objekten der Plasmolyse zuweilen eine Lebendfärbung (s. d.) vorangehen. oder aber man benutzt mit Eosin gefärbte plasmolysierende Flüssigkeiten: in letzterem Falle erscheint der plasmolysierte Plasmaschlauch ungefärbt und wird von einer gefärbten Zone umgeben. Für vergleichende Untersuchungen müssen Gewebestücke gewählt werden, deren Zellen gleich groß und gleichen Turgor besitzen (H. de Vries, Jahrb. f. wiss. Bot., 1883, XIV. S. 443).

Beim Ersatz der Reagentien durch Wasser wird die Plasmolyse aufgehoben, das Cytoplasma dehnt sich wieder bis zur Zellwand aus. Bisweilen lösen sich während der Kontraktion Stücke vom Plasmakörper ab. Sie werden beim Auswaschen wieder von dem sich erweiternden Plasmaschlauch aufgenommen. Bei schmalen und langen Zellen zerfällt der Plasmaleib oft in mehrere Teilstücke. die sich in einigen Fällen schwer oder gar nicht nach erfolgtem Zusatz von reinem Wasser wieder vereinen. Alsdann hat sich die Oberfläche des Protoplasten verändert, wahrscheinlich durch Bildung einer Art von Haptogenmembran (Haptogen wird das Häutchen genannt, das sich an der Oberfläche der Kolloide bildet). Beim Rückgang der Plasmolyse in stark plasmolysierten Zellen (Allium cepa) durchbricht das Plasma zuweilen den kontrahierten Plasmaschlauch. Durch langes Liegen in plasmolysierenden Lösungen erfolgen in behäuteten Zellen (Helodea, Daucus, Allium) Kontraktionserscheinungen von Zellkern. Chromatophor und Körnerplasma [1]).

[1]) E. Küster, Ber. d. bot. Ges., 1909, XXVII, 597. Flora, 1910. C, 267 u.: Ztschr. f. Bot., 1910, II, 689.

Bei Bakterien und Cyanophyceen findet nur selten eine vollständige Ablösung des Protoplasmas von der Membran statt[1], da dem Plasma größere Safträume fehlen und wohl auch eine festere Verbindung zwischen Plasma und Membran besteht. Bei Cyanophyceen sind Lösungen stärkerer Konzentration erforderlich (bei Tolypothrix 20% Salpeter). Hierbei erfolgt eine Verkürzung der Zellfäden um 25%. Eine geeignete Flüssigkeit, die Bakterien plasmolysiert und gleichzeitig fixiert, ist eine mit Jod gesättigte 10% Chlornatriumlösung (A. Fischer, Plasmolyse d. Bakt., Sächs. Ak. Sitzb., 1890, S. 52). Die Plasmolyse läßt sich verfolgen, wenn man das Eintrocknen eines hängenden Tropfens unter dem Mikroskop beobachtet. Der zur Plasmolyse nötige Salzgehalt stammt aus den Nährböden der Kulturen. — Bei Spirogyren wird durch Vorbehandlung mit 0.03—0.1% Sodalösung die Empfindlichkeit für Salpeter und Kochsalz stark vermindert; Vorbehandlung mit 0.1% Zitronensäurelösung verstärkt anderseits die schädigende Wirkung der Plasmolyse (Lepeschkin, Lit. S. 445,3). Im allgemeinen wird die Koagulation der Plasmamembran durch die saure Reaktion befördert und durch die alkalische gehindert. Bei einigen Meeresalgen wirken isomotische Zuckerlösungen stärker als isomotische Kochsalzlösungen (B. M. Duggar, Trans. Ak. St. Louis, 1906, XVI, 473). Bei Diatomeen hebt sich das Plasma meist an mehreren Stellen bogenförmig vom Kiele her ab (Benecke, Karsten.)

Ein spontaner Rückgang der Plasmolyse erfolgt bei längerem Liegen der Objekte in den plasmolysierenden Flüssigkeiten und kommt durch Eindringen der Lösungen in den Protoplasten zustande. Bei Keimpflanzen (Vicia, Helianthus u. a.) erfolgt der Rückgang in Rohrzucker und Salpeter (A. Wieler, Ber. bot. Ges., 1886, V, 375), bei Algen nach einigen Stunden auch in Chlornatrium (M. Janse, Bot. Centrbl., XXXII, 21), bei Bakterien nach 1—2 Stunden in 2.5 Salpeter, 1.25 Chlornatrium oder Chlorammon und in 15% Rohrzucker, in stärkeren Lösungen (5—10% Salpeter) viel schneller (A. Fischer, Jahrb. wiss. Bot., 1894, XXVII, 1). Die Verhältnisse liegen recht verschieden. H. de Vries hat bei 5stündiger Einwirkung von 7% Salpeter, Neutralsalzen u. a. (Beta, Fragaria), Klebs bei Helodea. Moosen, Farnprothallien in Zuckerlösung keinen Rückgang beobachtet.

Während bei der Plasmolyse der gesamte Plasmaleib in seiner Lebensfähigkeit nicht gestört wird, kann man bei der sogenannten anormalen Plasmolyse den Plasmaleib soweit abtöten, daß nur der Tonoplast (die Vakuolenwand) und die von diesem umschlossene Vakuole am Leben bleibt. De Vries[2]) benutzte eine mit Eosin gefärbte 10%ige Kalisalpeterlösung (Spirogyren). Zunächst erfolgt normale Plasmolyse, so lange bleibt der gesamte Plasmaleib farblos. Nach

[1]) A. Fischer, Die Empfindlichk. d. Bakterienz. u. d. bakt. Serum, Ztschr. f. Hyg. u. Infekt., 1900, XXXV, 51 u: F. Brand, Üb. d. osmot. Verh. d. Cyanophyceenz., Ber. d. bot. Ges., 1903, XXI, 302.

[2]) H. de Vries, Plasmolyt. Stud., Jahrb. f. wiss. Bot., 1886, XVI, 465.

2 Stunden fangen die äußeren Schichten des Plasmas sich zu färben an, sie sterben ab, bald ist das ganze Plasma gefärbt und nur die Zellsaftvakuolen erscheinen farblos, da der lebende Tonoplast die Lösung am Eindringen hindert. Die Vakuolen schnüren sich zuweilen ein (durch den Druck des abgestorbenen Plasmas), teils sind sie mehr oder weniger isoliert. In längeren Zellen kann die Einschnürung bis zur Teilung der Vakuolen fortschreiten; die Vakuolen können sich noch einige Tage am Leben halten. Went[1]) fixiert die Vakuolen mit $^1/_2$—1$^0/_0$ Chromsäure (1—2 Tage), dann folgt Auswaschen in strömendem Wasser und Behandlung mit Alkohol (20—95$^0/_0$, je 3—4 Stunden); aus dem fixierten Material werden in bekannter Weise Mikrotomschnitte hergestellt. Lidforss[2]) erhielt bei Potamogeton anormale Plasmolyse, wenn er die Schnitte zunächst mit einer nicht plasmolysierenden Sodalösung behandelte und dann erst 10$^0/_0$ Salpeter zufügte.

Die Plasmolyse dient zur Ermittelung des osmotischen Druckes (Pfeffer, Tröndle, Ber. d. bot. Ges., 1909, XXVII, 71 u. a.), zur Sichtbarmachung von im Zellsaft gelösten Körpern (S. 193, 220, 249 u. a.), zum Nachweis der Lokalisation (S. 116, $_1$ u. ob.) gewisser Inhaltskörper, bei der Feststellung von Membranveränderungen (Höhlke, Bot. Centr., Beih., 1901 u. Lit. S. 222, $_4$), bei der Schleimbildung, zur Isolierung der Protoplasten (J. af Klercker, 1892) und zum Nachweis zarter Plasmabeläge (Th. Lange, Flora, 1891, S. 393) in lebenden Elementen (Plasmolyse mit 5$^0/_0$ Salpeter, Fixierung mit Pikrinsäure, Färbung).

Als **Plasmoptyse** bezeichnet A. Fischer (Ber. bot. Ges., 1906) den Austritt des Protoplasmas aus Bakterien, wobei bei geißeltragenden Bakterien die Membran intakt bleibt, bei geißellosen gesprengt wird. Nach A. Meyer handelt es sich um kuglige Anschwellung der ganzen Bakterienzellen (Ber. bot. Ges., 1906, XXIV, 208). Nach Schuster ist die Plasmoptyse eine Absterbeerscheinung (Ber. bot. Ges., 1910, XXVIII, 496). Bei Cyanophyceen (Brand) tritt das Plasma teils durch Zellsprengungen, teils „durch die Pori der Plasmodesmen" heraus, wenn auf die Fäden nach kurzer Einwirkung ($^1/_2$ Min.) von reinem Glyzerin schnell wieder Wasser zutritt.

Der Zellkern.

Zellkerne finden sich jedenfalls in den Zellen aller Pflanzen, nur bei den Cyanophyceen ist das Vorhandensein echter Zellkerne bis in die neueste Zeit strittig. In jugendlichen Zellen ist der Zellkern gewöhnlich rund, scheibenförmig, in älteren Zellen nimmt er langgestreckte Formen an, erscheint stab- oder spindel-

[1]) F. A. F. C. Went, D. Vermehr. d. normal. Vakuol. d. Teil., Jahrb. f. wiss. Bot. 1888, XIX, 295.

[2]) B. Lidforss, Eigenartige Inhaltskörper bei Potamog. praelong., Bot Centrbl., 1898, LXXIV, S. 305.

förmig gestreckt, im Samen zuweilen von unregelmäßiger Gestalt. Die Größe der Zellkerne schwankt bedeutend. Bei den Pilzen sind sie oft nur 1—2 μ, bei Bakterien nur 0.3 μ groß, bei den Dikotylen 5—10 μ. Ranunculaceen, Nymphaeaceen, Monokotylen führen größere Kerne (30—50 μ), die langgestreckten Kerne (Fadenkerne) in den Sekretbehältern von Aloe werden 80 : 40 μ groß, im Schleim von Lycoris radiata bis 1.5 mm lang. Im allgemeinen findet sich in jeder Zelle nur ein Kern, doch kommen in langgestreckten Elementen (Bastfasern, Milchröhren) auch mehrere bis zahlreiche Kerne vor. Bei endgültiger Ausbildung der Zellen lösen sich die Kerne meist auf. „Bei den Entwicklungs- und Gestaltungsvorgängen der Zelle" (Haberlandt) kommt ihnen eine große Bedeutung zu. Auch als Träger der Vererbungssubstanz werden die Zellkerne angesprochen.

Bei den meisten niederen und bei allen höheren Pflanzen hat der ruhende Zellkern einen komplizierten Bau, der erst an fixierten und gefärbten Kernen deutlich hervortritt. Man sieht an gefärbten Objekten, daß der Kern aus einem zarten Gerüstwerk eines nicht färbbaren Fadens besteht, dessen Substanz als Linin bezeichnet wird. In dem Faden liegen stark färbbare Körnchen, die man als Chromatin bezeichnet. Zwischen den Windungen des Lininfadens liegen 1—3 Kernkörperchen, Nukleolen, die den am stärksten färbbaren Teil des Zellkernes bilden, sich anders als die Chromatinkörnchen färben und meist kugelige, doch auch länglich eiförmige, sichelförmige, selbst gelappte Gestalt besitzen, homogen, seltener vakuolisiert sind und an ungefärbten Kernen ohne weiteres als stark lichtbrechende Gebilde hervortreten. Nukleolen, die im Cytoplasma liegen (extranukleare Nukleolen), finden sich bei Liliaceen. Die Nukleolen bestehen wahrscheinlich aus Chromatin und Plastin; sie sind typische Reservekörper, da sie das Material zur Bildung der Chromosomen liefern und bei höheren Pflanzen ebenfalls kinoplasmatische Zellbestandteile führen. Bei der sog. Dreifachfärbung (s. w. unt.) werden die Nukleolen rot, die Chromatinkörner violettblau. Das Gerüstwerk des Kernes findet sich in der mit einer homogenen Flüssigkeit, dem Kernsaft, erfüllten Kernhöhle, die von der kinoplasmatischen (dem Cytoplasma angehörenden) Kernwand umhüllt wird.

Der Zellkern gehört zu den spezifisch schwersten Bestandteilen der Zelle (Lit. S. 18, 1). Beim Zentrifugieren werden die Nukleolen herausgeschleudert und gelangen mit den Kernen an das zentrifugale Ende der Zellen.

Die Zellkernteilung ist fast ausschließlich eine indirekte (mitotische) Teilung (Karyokinese). Zuweilen beruht die Kernteilung auf Durchschnürungsprozessen (direkte, amitotische T., Fragmentation), so bei niederen Pflanzen (Characeen, Tradescantien), in alternden Zellen u. Wundgeweben. — Eine eingehende Darstellung des Baues der Zellkerne und der bei der Karyokinese stattfindenden Vorgänge würde hier zu weit führen; es muß in dieser Hinsicht auf die botanische Spezialliteratur verwiesen werden, in der sich auch zahlreiche Abbildungen finden.

Kernfreie Zellen, deren Lebensdauer nur eine kurze ist, kann man aus in Teilung begriffenen Conjugaten erhalten. Man läßt auf Spirogyra oder Zygnema während der Teilung 15 Minuten bis mehrere Stunden Chloralhydrat (0.25—1.5 ccm konz. Lösung in 100 ccm Wasser),

Äther (0.5—2.5 ccm) oder Chloroform (1.25—7.5 ccm) einwirken und bringt die Algen dann in frisches Wasser. Unter den einzelnen Schwesterzellen finden sich Zellen mit einem großen Kern oder mit zwei Kernen normaler Größe und anderseits kernlose Zellen. Der gleiche Effekt läßt sich durch plötzliche Abkühlung erzielen[1]). Ähnliche Beobachtungen machten Haberlandt (Bryonia), Schmitz u. a.

Bei diesen Vorgängen treten Kernteilungen ein, die Amitosen und abnormalen Mitosen ähnlich sind. Dergleichen lassen sich künstlich hervorrufen nach Nathansohn (Jahrb. wiss. Bot., 1900, XXXV, 48) bei Spirogyren (über Nacht kühl gestandene Algen gelangen auf 3/4 Stunden in 1% wässerige Ätherlösung), bei Closterium (1/4% Ätherlösung), Tradescantia virginica (Staubfädenhaare, Blütensprosse mit Knospen 36 Stunden in 2% Ätherlösung unter Glasglocke), nach Wisselingh (Bot. Ztg., 1903, LXI, 202) bei Spirogyra (2—12 Tage in 1/20% Chloralhydrat in Grabenwasser), nach Wasielewski (Jahrb. wiss. Bot., 1904, XXXIX, 581) bei Vicia faba (Keimwurzeln, Bohnen 24 Stunden quellen, 5 Tage in 0.1—0.2% Chloralhydrat oder in 2% Ätherwasser, dann auswaschen und auf einige Tage in Sägespäne aussäen). In allen Fällen handelt es sich um echte Mitosen, die durch Äther oder Chloral in verschiedenen Stadien zum Stillstand gebracht wurden und Amitosen vortäuschen (B. Němec, Jahrb. wiss. Bot., 1904, XXXIX, 645).

Die Kernwand des ruhenden Kernes ist wenig tinktionsfähig. Sie läßt sich nach Schwarz (Lit. S. 442, 1) durch eine konz. wässerige Lösung von Kaliumdichromat oder durch 20% Kochsalz- oder Monokaliumsulfatlösungen deutlich sichtbar machen. Während der Karyokinese wird sie resorbiert. Um sie in den verschiedenen Phasen der Karyokinese verfolgen zu können, ließ van Wisselingh (Bot. Ztg., 1902, LX, 115) lebendes Material langsam sterben (Spirogyra) und benutzte zunächst 10% Kalisalpeter. Die besten Resultate gaben 1 und 2% mit Eosin gefärbtes Chloralhydrat. Der Kern wird „sehr deutlich gefärbt und ist also, wenn seine Wand noch intakt ist, scharf von seiner Umgebung zu unterscheiden“.

Die Grundmasse des Zellkernes verhält sich nach Zacharias wie folgt: „Sie quillt in verd. Salzsäure und Magensaft, färbt sich nicht in Essigkarmin, Methylgrünessigsäure (nach Behandlung mit Magensaft), quillt in verd. Kalilauge und wird dann beim Erwärmen zerstört, desgleichen verschwindet sie, wenn 0.5% Kalilauge, 0.5 oder 1% Soda auf die nach der Verdauung zurückbleibenden Reste einwirken. In stärkerer Salzsäure bleiben Grundmasse und Verdauungsreste gut erhalten. Die Grundmasse färbt sich nach Vorbehandlung mit verd. Salzsäure mit Methylenblau-Fuchsin S rot. Mit Methyl-

[1]) J. Gerassimoff, Über ein Verfahren, kernlose Zellen zu erhalten (Zur Physiologie der Zelle), Moskau, 1896.

grünessigsäure-Glaubersalz wird sie ohne zu quellen blau. Sie quillt auch nicht in 10% Chlornatrium und in Glaubersalzlösung."

Im allgemeinen sind wir über die Mikrochemie des Zellkerns noch sehr ungenau unterrichtet und die zur Verfügung stehenden Reaktionen, die S. 409 u. folg. angeführt sind, haben bisher nur zum Teil übereinstimmende Ergebnisse gezeitigt. Die Methoden zum Nachweis des Phosphors (S. 91) und des Eisens im Zellkern sind noch unsicher, der Jodgehalt des Kernes noch ganz ungewiß. Überdies liegen derzeit noch verhältnismäßig wenige rein mikrochemische Arbeiten vor, denn bei den Zellkernstudien stehen Färbungen an erster Stelle. Die Ansichten, ob den Färbungen chemische Reaktionen zugrunde liegen, sind geteilt (S. 419). Wenn wir uns aber der Färbungen zur Identifizierung zweifelhafter Gebilde bedienen, so können wir diese Färbungen als mikrochemische Reaktionen im weiteren Sinne betrachten. Wohl ist der Zellkern in lebenden Zellen meist ohne weiteres zu erkennen, doch schwer ist seine Bestimmung zuweilen in getrockneten Pflanzen und vielfach dann, wenn stärke- oder aleuronhaltige Gewebe vorliegen oder der Kern nur klein und von ungewöhnlicher Form ist. Nicht immer führt direktes Eintragen der Schnitte in Chloralhydrat zum Ziel. Leicht werden andere Inhaltskörper als Zellkerne angesprochen. Häufig sind Verwechslungen von Zellkernen und Oxalaten. —

Es sollen zunächst jene einfachen Methoden angeführt werden, die Fixieren und Färben vereinen, auf dem Objektträger ausgeführt werden und zum Nachweis ruhender Kerne meist benutzt werden.

Gute Erfolge liefert Methylgrünessigsäure[1] (1—2% Essigsäure wird mit Methylgrün bis zur blaugrünen Färbung versetzt). Das Reagens wird mit einem Tropfen verd. Glyzerins versetzt und das Objekt eingelegt. Die Methode wird auch herangezogen, um Teilungszustände auf bequeme Weise schnell beobachten zu können; man zerdrückt die jugendliche Anthere einer Monokotylenblüte auf dem Objektträger in dem Reagens. (Carnoy[2]) verwendet eine stärkere Essigsäure [1 Teil Eisessig, 3 Teile absoluten Alkohol]). In gleicher Weise läßt sich Jodgrün oder Gentianaviolett, in 1—2% Essigsäure gelöst, benutzen.

[1]) Methylgrün wurde von J. Hanstein zum Färben von Chlorophyllkörnern benutzt, später von Treub zur Färbung von Zellkernen empfohlen (S. d. cell. vég. à plus. noyaux, Arch. Néerl., 1880, XV, S. 7). In Kombination mit Essigsäure führte E. Strasburger den Farbstoff ein (Zellbild. u. Zellteil., 1880).

[2]) J. B. Carnoy, La cytodiérèse de l'œuf chez quelq. Nématodes, La Cellule, 1887, III, S. 6 u. 276.

Die Färbung hält sich nur wenige Stunden. Jugendliche Membranen sollen in dem Reagens zuweilen stark aufquellen.

Nigrosin-Pikrinsäure führte Pfitzer[1]) ein (eine konz. wässerige Pikrinsäurelösung wird mit wenig wässeriger Nigrosinlösung bis zur tief olivgrünen Färbung versetzt). Die Objekte bleiben einige Stunden bis 1 Tag in der Farblösung, werden mit Wasser, Alkohol oder Glyzerin ausgewaschen: die Färbungen sind haltbar. Nach Glyzerin folgt Einschließen in Glyzerin-Gelatine; bessere Resultate gibt Auswaschen mit Alkohol, dann Nelkenöl, Kanadabalsam. Die Färbung des Plasmas hängt von der Beschaffenheit desselben ab, dünne Plasmaschichten werden kaum wahrnehmbar gefärbt. Zellkern und Nukleolen aber sehr stark blau. Zellulosemembran und Stärke bleiben ungefärbt.

Hämatoxylinfärbungen (früher für die besten gehalten, Johow, Zellk. in Sekretbeh. d. Monocotyl., Diss. Bonn, 1880, S. 9) werden auch heute noch vielfach zu rein diagnostischen Zwecken herangezogen. Hämatoxylin färbt in Gegenwart einer Beize, eines Eisen-, Kupfer- oder Aluminiumsalzes, die Zellkerne oft schon nach 1stündiger Einwirkung tiefblau. Sind diese Salze im Gewebe enthalten, dann tritt mit Hämatoxylin allein eine wenn auch schwache Färbung ein. Will man größere Objekte färben (Stückfärbung), dann beläßt man sie mehrere Tage in einer mit Wasser verd. Hämatoxylinlösung. Alkoholmaterial muß zur Vermeidung von Niederschlägen zuvor auf einige Zeit in Wasser gelegt werden. Zur Differenzierung benutzt man Säurealkohol, 2% wässerige Alaunlösung, 1% Kaliumdichromat oder konz. wässerige Pikrinsäure. Diese Flüssigkeiten müssen vor dem Übertragen der Präparate in Alkohol, Kanadabalsam oder Glyzeringelatine sorgfältig ausgewaschen werden. Stärkereiche Schnitte entwässert man nach der Färbung (in einfachster Weise durch Austrocknen an der Luft) und fügt Nelkenöl zu, wodurch die Stärkekörner hyalin werden und die Kerne sofort auffallen.

Hämatoxylinlösungen werden meist nach Böhmer und Delafield bereitet. Böhmer: Lös. I (0.35 g krist. Hämatox. in 10 g abs. Alkohol), Lös. II (0.3 g Kalialaun in 10 g Wasser). 10 Tropfen von I werden mit II gemischt, die Mischung wird nach mehrtäg. Stehen im Licht filtriert. — Delafield: Lös. I (gesättigte Lös. von krist. Hämat. in abs. Alk.), Lös. II (gesättigte wässer. Lös. von krist. Ammoniakalaun). 4 ccm von I mit 150 ccm von II mischen, die Mischung nach 8tägigem Stehen im Lichte filtrieren; das Filtrat, mit 22 ccm Glyzerin und 25 ccm Methylalkohol versetzt, bildet das Reagens. — Sofort gebrauchsfertig ist

[1]) E. Pfitzer, Über ein Härt. u. Färb. vereinig. Verf. f. d. Unters. d. plasmat. Zellleibes, Ber. d. bot. Ges., 1883, 1, S. 44. — Nigrosin wurde als Kernfärbemittel zuerst von L. Errera benutzt (Coloration des noyaux par la nigrosine, Soc. belg. de Micr., 1881, VII, No. 8).

die Lös. von P. Mayer (1 g Hämat., 1000 g Wasser, 0.2 g Natriumjodat, 50 g Alaun), sowie die von Hansen, die aber umständlicher in der Herstellung ist (1 g krist. Hämat. in 10 g abs. Alkohol, dann 20 g Kalialaun in 200 g Wasser. Am anderen Tage beide Lösungen mischen und 200 g des Gemisches mit 3 ccm konz. wässer. Kaliumpermanganatlös. zum Sieden erhitzen, abkühlen, filtrieren). Weitere Vorschriften (Apáthy, Ehrlich bei Behrens-Küster, Mikr. Tab., 112.

Bei aleuronhaltigen Samen[1]) ist die Entfernung des Öles notwendig; man wird vorteilhaft mit einer wässerigen Lösung von Methylenblau färben. Die Aleuronkörner, die gleichfalls den Farbstoff speichern, werden entfernt (eintägige Behandlung mit 0.3% Salzsäure). Die Aleuronkörner vieler Pflanzen sind nun vollständig gelöst, die schwerlöslichen immerhin so angegriffen, daß sie die Beobachtung nicht stören. Will man aber die schwerlöslichen Aleuronkörner gänzlich entfernen, so läßt man 24 Stunden Pepsin-Pankreatin einwirken (1 Teil Pepsin, 1 Teil Pankreatin-Glyzerin, 20 Teile 0.3% Salzsäure). In schwierigen Fällen wird die Färbung durch Chloralhydrat unterstützt: Chodat[2]) läßt auf die mit Methylgrünessigsäure gefärbten Protococcoideen Chloralhydrat (8 : 5) einwirken, welches Chromatophoren und Plasma löst und die Stärke verquillt, und A. Meyer[3]) empfiehlt zur Färbung der Kerne in Pollenkörnern Chloralcarmin (0.5 g Carmin, 30 ccm Alkohol, 30 Tropfen off. Salzsäure auf dem Wasserbade 1/2 Stunde kochen, nach dem Erkalten 25 g Chloralhydrat zufügen, mehrmals filtrieren; die Lösung ist haltbar).

Der von Overton (Lit. S. 254, 1) empfohlene mikrochemische Nachweis (Nitella, stärkereiche Eizelle) durch Bildung von Berlinerblau (S. 413) ist umständlich; die Lösung der Stärke erfolgt bei der stark verd. Säure zu langsam, man muß schließlich zum Chloral greifen. — In Sekretbehältern (Lit. S. 170, 3) lassen sich die Kerne mit Chromatschwefelsäure (S. 98 oder ein Gemisch von Kaliumdichromat und Schwefelsäure im Überschuß oder 1. Wasser, 4. konz. Schwefelsäure, gesättigt mit Chromsäureanhydrid) sichtbar machen.

Die bisher angeführten Färbungen dienen überwiegend nur diagnostischen Zwecken. Zu eingehenden Studien, besonders der Teilungsvorgänge, sind gut fixierte, gehärtete und gefärbte Schnitte erforderlich (S. 41). Diese Zellkernforschungen haben sich zu einem selbständigen Zweige entwickelt. Es muß auf die Speziallitcratur verwiesen werden. Immerhin scheint es angebracht, einige der zum Fixieren und Färben dienenden Methoden anzuführen, vorzüglich die Zusammensetzung der Reagentien zu erwähnen, zumal die Färbungen

[1]) W. Koeppen, Verhalt. d. Zellk. im ruhend. Sam., Diss. Jena, 1887, S. 7.

[2]) R. Chodat, Entw. d. Eremosphaera viridis, Bot. Ztg., 1895, LIII, S. 137.

[3]) A. Meyer, Chloralcarmin zur Färbung der Zellkerne der Pollenkörner, Ber. deutsch. bot. Ges., 1892, X, S. 363.

nicht nur zum Studium des Zellkernes sondern auch der übrigen Bestandteile des Protoplasten dienen.

Auf die, den Färbungen zugrunde liegenden Prozesse kann hier nicht näher eingegangen werden. Vielfach wird die Ansicht vertreten, daß die Anilinfarben mit den Eiweißkörpern chemische Verbindungen eingehen, daß Verbindungen der Farbsäuren entstehen, zumal Heidenhain (Ztschr. wiss. Mikr., 1902, Arch. ges. Phys., 1902 u. a.) gefunden hatte, daß Eiweiß sowohl in Lösung als auch in fester Form sich mit Farbsäuren und Farbbasen in der Farbe der betreffenden Farbsalze färbt. Von Michaelis (Pflüg. Arch., 1903) wurde aber darauf hingewiesen, daß Zellulose sich in dieser Hinsicht ebenso verhält und von anderer Seite wird die Färbung als ein rein physikalischer Vorgang betrachtet. Besonders A. Fischer (Fix., Färb. u. Bau d. Pl., 1899) hat die Färbung auf physikalische Prozesse zurückgeführt, ihm haben sich u. a. Miehe (Flora, 1903, LXXXVIII, 105) und Arnoldi angeschlossen. Die physikalischen Eigenschaften eines Körpers stehen indessen mit seiner chemischen Konstitution in nahem Zusammenhang.

Daß man mit den üblichen Methoden vielfach Kunstprodukte erhält, hat A. Fischer[1]) gezeigt. Pepton, Hämoglobin, Casein, Conglutin u. a. wurden mit den gebräuchlichsten Fixierungsmitteln behandelt und zeigten schöne Granulabildung. Holundermark wurde mit 2 bis 10% Peptonlösung injiziert, mit 1% Osmiumsäure, Altmanns Mischung fixiert, gefärbt und geschnitten. Die Präparate ließen Zellkerne, Mikrosomen, Granula u. a. erkennen. Des weiteren lassen sich mit einer Albumoselösung je nach ihrer Konzentration und mit ein und derselben Fixierungsflüssigkeit verschieden gestaltete Fällungen erzielen, die mit Farbengemischen verschiedene Färbungen annehmen. Eine wässerige 3% Albumoselösung wird durch Platinosmiumessigsäure in großen Granulis ausgefällt, eine $^1/_{10}$% Lösung als winzige Körnchen. Mischt man beide Fällungen und färbt das Gemisch mit Flemmings Safranin-Gentiana, dann werden die großen Fällungen rot, die kleinen violett gefärbt.

Die lebenden Zellkerne verhalten sich anders wie die getöteten (fixierten). Schon die Versuche von Campbell[2]), der im Anschluß an die Lebendfärbung des Plasmas (S. 444) lebende Zellkerne (Tradescantia virg.) mit 0,001—0,002% wässerigen Lösungen von Methylviolett, Mauvein oder Dahlia färbte, hatten nur geringen Erfolg. Damit ist jedoch noch nicht erwiesen, daß die lebenden Zellkerne eine völlig

[1]) A. Fischer, Zur Kritik der Fixierungsmethoden und der Granula, Anat. Anz., 1894, IX, S. 678 u.: Cyanophyc. u. Bakt., Jena 1897.

[2]) H. D. Campbell, The Stain. of liv. Nucl., Arb. Tübing. Inst., II, S. 569.

andere Zusammensetzung als die abgestorbenen besitzen. Wahrscheinlich findet beim Absterben nur eine Umsetzung labiler Eiweißgruppen statt.

Eine kritische Studie über den Wert der Fixierungsmittel hat von Wasielewski[1]) (Wurzelspitzen von Vicia faba) ausgeführt. Die besten Resultate geben die Gemische von Flemming, Hermann und vom Rath. Dann folgten die essigsäurehaltigen Flüssigkeiten (Zenker, Carnoy, Boveri, Flemming, Keiser). Nicht so gut wie die Gemische fixieren die Einzelflüssigkeiten mit Ausnahme von Platinchlorid. Durch besondere Eigenschaften sind ausgezeichnet: Osmiumsäure, Kaliumbichromat (erhalten die Zellmasse am vollständigsten), Platinchlorid (bestes Einzelmittel für Kernteilungen), Essigsäure, Pikrinsäure (dringen schnell ein, sind strukturerhaltend).

Im folgenden ist die Zusammensetzung der meist gebrauchten **Fixierungsmittel** angegeben:

Osmiumsäure, 1 %, 1849 von Barnell, 1865 von Schultze[2]) eingeführt, dient in Dampfform zum Fixieren kleiner Objekte, die im flachen Hängetropfen 20—30 Minuten auf die Osmiumflasche gebracht werden (Meeresalgen, Berthold). Größere Pflanzenstücke gelangen auf mehrere Stunden in 1 % Lösung, eintretende Schwärzung des Gewebes (Fett) kann leicht beseitigt werden (S. 160). — Jod (Brom) für kleinere Objekte in Dampfform. Die beschickten Objektträger kommen in den Jod-Exsikkator (S. 14) oder als Hängepräparate auf die Öffnung der Jodgefäße. Nach Fixierung wird das Auswaschen umgangen und das Jod durch Erwärmen der Präparate auf 30° entfernt. Als Fixierlösung dient Jodjodkalium und Jod-Meerwasser (Meerwasser mit Jodalkohol 1 : 10 bis zur hellbraunen Färbung versetzt). Meeresalgen werden 1 Minute in der Lösung umgeschwenkt, dann in 50 % Alkohol übertragen und sind tinktionsfähig. Bei quellbaren Membranen am besten „45—50 % Alkohol, der statt destilliertem Wasser Seewasser enthält" (Tobler, Lit. S. 4, 4, dann S. 36, 3 u.: G. Berthold, Beitr. z. Morph. u. Phys. d. Meeresalgen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1882, XIII, S. 704). — Pikrinsäure (konz. wässer. od. alkohol. Lös.), Einwirkung bis 1 Tag, Auswaschen mit Alkohol. Störende Gelbfärbung wird mit Lithion-Alkohol entfernt (einige Tropfen einer konz. wässer. Lös. von Lithion carbonicum in 95 % Alkohol)[3]). Lithionpikrat ist alkohollöslich. — Chromsäure (0,5—1 % wässer. Lös.), Einwirkung bei kleineren Objekten mehrere Stunden, bei größeren (Zerkleinern!) 1—2 Tage, gründliches Auswaschen in fließendem Wasser, Härtung in Alkohol von steigender Konzentration. Fällt gleichzeitig Gerbstoffe. Für Färbungen Salzsäure-Alkohol zur Entfernung des Chroms. — Essigsäure (1—3 %), Sublimat (konz.,

[1]) W. von Wasielewski, Über Fixierungsflüssigkeiten in der botanischen Mikrotechnik, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1899, XVI, S. 303.

[2]) M. Schultze, Zur Kenntn. d. Leuchtorgane von Lampyris splendidula, Arch. mikr. Anatom., 1865, I, S. 132.

[3]) O. Jelinek, Methode z. leicht. u. schnell. Entf. d. Pikrins. aus Geweben, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1894, XI, S. 243.

wässer. od. alkohol. Lös., Einwirkung bis 1 Tag, Auswaschen mit 1 % Jodalkohol, dann Alkohol) und Platinchlorid (0.3 % wässer. Lös., Einwirkung bis 1 Tag) werden meist nur in Gemischen benutzt.

Chromessigsäure (70 Vol. Chroms. 1 %, 5 Vol. Eisessig, 90 Vol. Wasser), Einwirkung bis 24 Stunden, bei Süßwasseralgen nur bis 12 Stunden, weil sonst manche Algen teilweise zerfallen (Lit. S. 36, 4). Auswaschen in Wasser, Härtung in Alkohol steigender Konzentration. — Chromosmiumessigsäure (Flemmings Gemische)[1], vielfach anwendbar, Gewebestücke möglichst klein, Auswaschen in fließend. Wasser, dann dest. Wasser, Alkohol. Die fixierten Objekte lassen sich in Wasser-Alkohol-Glyzerin (gleiche Teile) aufbewahren, ohne ihre Tinktionsfähigkeit zu verlieren. Schwache Lös. (0.25 % Chroms., 0.1 Osmiums., 0.1 Essigs. in 100 Wasser); starke Lös. (15 Vol. Chroms. 1 %, 4 Vol. Osmiums. 2 %, 1 Vol. Eisessig). — Als Ersatz dient in neuerer Zeit Zinkchlorid-Eisessig von Juel[2]) (je 2 % Zinkchlorid und Eisessig in 50 % Alkohol). — Sublimateisessig (Keiser, 10. Sublimat, 300. Wasser, 3. Eisessig) von Strasburger u. a. viel benutzt (bei Farnen unbrauchbar, F. Rosen, Cohns Beitr., 1895, VII, S. 225), Einwirkung mehrere Stunden, dann Wasser, Alkohol, Jodalkohol, Alkohol. — Zenkersche Lösung[3]) (5. Sublimat, 2.5 Kaliumdichromat, 1. Natriumsulfat, 100. Wasser, 1 ccm Eisessig) empfiehlt Goetz (Eiknospe b. d. Characeen, Diss., Freiburg) bei 20stündiger Einwirkung für Characeen. — Platinchlorid-Chromessigsäure (Merkels Gemisch, Böhm u. Oppel, Taschenb. d. mikr. Techn., 1900, S. 199), Einwirkung bis 24 Stunden (je 100 Vol. Chroms. 1 % u. Platinchlorid 1 % u. 600 Vol. Wasser). Bei Meeresalgen Aufbewahren in Seewasser-Alkohol 1 + 1 (Tobler). — Platinchlorid-Osmiumessigsäure (F. Hermanns Gemisch, Entstehung d. karyokin. Spindel, Arch. f. mikr. Anat., XXXVI, S. 569), Einwirkung 1—2 Tage (15 Vol. 1 % Platinchlorid, 2—4 Vol. 2 % Osmiums.; 1 Vol. Eisessig), sehr viel gebraucht; Auswaschen in fließendem Wasser, Härtung in Alkohol steigender Konzentration. — vom Rathsche[4]) Pikrinsäuregemische: Pikrinosmiumessigsäure (200 ccm gesättigte, wässer. [destill. Wasser], filtr. Pikrins., 12 ccm 2 % Osmiums. und nach einigen Stunden 2 ccm Eisessig). Für Kernteilungsfiguren sehr geeignet, im Plasma aber fast stets Veränderungen. — Pikrinosmium-Platinchloridessigsäure, a) starke Lös., 200 ccm konz. wässerige Pikrins., 25 ccm 2 % Osmiums., 1 g Platinchlorid in 10 ccm Wasser gelöst und 2 ccm Eisessig; b) die schwache Lös. von gleicher Zusammensetzung, aber nur 12 ccm 2 % Osmiums. Die starke Lös. wurde von Oltmanns[5]) mit 10—20 Teilen

[1]) W. Flemming, Über die Wirkung von Chromosmiumessigsäure auf Zellkerne, Arch. f. mikr. Anat., 1895, XLV, S. 162.

[2]) H. O. Juel, Studien über die Entwicklungsgeschichte von Saxifraga granulata, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1907, XXIV, S. 339.

[3]) K. Zenker, Chromkali-Sublimat-Eisessig als Fixierungsmittel, Münch. Med. Woche, 1894, XLI, S. 532.

[4]) O. vom Rath, Beitr. z. Kenntn. der Spermatogenese von Salamandra maculosa, Ztschr. f. wiss. Zool., 1893, LVII, S. 97 und: Zur Konservierungstechnik, Anat. Anz., 1895, XI, S. 280.

[5]) Fr. Oltmanns, Entwicklgesch. d. Florideen, Bot. Ztg., 1898, LVI, S. 99.

Seewasser verd. bei Florideen benutzt. Einwirkung 1—5 Minuten, Auswaschen mit 70 % Alkohol. Damit werden auch die Chromatophoren fixiert. Bei 10 Minuten langer Einwirkung dient sie bei Characeen (Goetz) mit 12stündiger Nachbehandlung zur Entfernung der Inkrustationen. — Pikrinschwefelsäure, die nach Lee und Wasielewski „auf Plasma und Kern nachteilig" wirkt, wird vornehmlich bei niederen Pflanzen benutzt und zwar kommen auf 100 Vol. Wasser 2 Vol. konz. Schwefels., dann Pikrins. bis zur Sättigung (P. Mayer, Mitt. Neapel, 1881). Diese Lös. wird mit dem 3fachen Vol. Wasser verdünnt (sog. Kleinenbergsches Gemisch): sie läßt sich leichter als die reine Pikrinsäurelösung auswaschen. — Die Pikrinchromschwefelsäure Keisers besteht aus je 1 g Pikrins. und Chroms., 10 g Schwefels. und 1000 g destill. Wasser. — Pikrinessigsäure wurde von Boveri (Zellst., Jenaisch. Ztschr., 1887, XXI, 423) empfohlen.

Zu den **Färbungen**[1]) dienen Anilinfarben, Hämatoxylin, Carmin u. a. Von den zahlreichen Anilinfarben seien ebenfalls nur einige angeführt:

Fuchsin (nach Zimmermann, Mikrot. S. 183), konz. wäss. Lös., 15—20 Minuten Einwirkung, Nachbehandlung mit Pikrins. (konz. Lös. in 70 % Alkohol), Auswaschen mit 90 % Alkohol, schnelles Abspülen mit abs. Alkohol, dann Xylol, Kanadabalsam. — Karbolfuchsin (Ziehlsche Lös., 1. Fuchsin, 5. Karbolsäure, 10. Alkohol, 100. Wasser) für Bakterien; bei Wurzelpilzen[2]) nach Fixierung mit Merkel. — Von Fuchsingemischen seien genannt: Fuchsin-Methylblau, die mit Fuchsin gefärbten Schnitte werden mit Pikrins. behandelt, dann Auswaschen in 90 % Alkohol und 1/4 Stunde in wässer. Methylblaulös. — Fuchsin-Methylenblau (Rosen). Nacheinander 0.001 % wässer. Fuchsinlös., 0.002 % wässer. Methylenblaulös., Alkohol, Xylol-Alkohol. Nach Ehrlich werden von gesättigten wässer. Lös. 5 T. Fuchsin mit 1 T. Methylenblau gemischt, die Mischung + 5 T. Wasser, nach 4 Tagen filtriert. Einwirkung 1—2 Tage, dann Pikrins. in 50 % Alkohol. Überfärbung wird durch Alkohol beseitigt.

Fuchsin-Jodgrün (Strasburger [B. Pract. 1897, S. 102 u. a.] 1 T. konz. wässer. Fuchsinlös. und 9 T. 0.1 % Jodgrünlös. oder beide Farbstoffe in 50 % Alkohol. Die Jodgrünl. wird der Fuchsinl. bis zur Violettfärbung zugesetzt. Guignard [Rev. gén. de Bot. 1889, I, S. 11

[1]) Göppert u. Cohn färbten Nitella mit Carmin (Rotation d. Zellinhaltes, Bot. Ztg., 1843, I, Nr. 37), Hartig studierte die Carminspeicherung der Zellkerne und färbte mit Lackmus, Gummigutti u. a. (Funkt. d. Zellk., Bot. Ztg., 1854, XII, Nr. 33 u. a.) Auf botanischem Gebiete ist Th. Hartig, auf tierhistologischem J. Gerlach der Begründer der Färbungen (Mikr. Stud. d. menschl. Morph., Erlangen 1858). Hierzu: H. Gierke, Färberei z. mikr. Zwecken, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1884, 1, 62, Holzner, Z. Geschichte d. Tinktionen, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1884, 1, 255, J. Sachs, Gesch. d. Botanik, 1875, 523. Anilinfarben (Rosanilin, Anilinblau, Anilinviolett) gebrauchte zuerst Waldeyer (Ztschr. f. rat. Med., 1863, XX, 200).

[2]) C. G. Björkenheim, Ztschr. f. Pflanzkr., 1904, XIV u. Fr. Zach, Sitzb. Wien. Ak., 1909, CXVIII, Abt. 1, S. 192.

und flg.] gebraucht wässerige Lösungen). Einwirkung, mikroskopisch zu kontrollieren, eine bis wenige Minuten, Zellkerne blaugrün, Plasma rot. Auswaschen mit Jodalkohol (0.1 g Jod, 1 ccm Essigsäure, 100 ccm Alkohol). Abspülen mit Xylol, Einschließen in Kanadabalsam. Fuchsin-Jodgrün läßt sich mit anderen Farbstoffen kombinieren. Die mit Sublimat, Alkohol oder Pikrins. fixierten Präparate gelangen zunächst auf einige Minuten in wässer. Safranin- oder Vesuvinlös. und darauf für eine Minute in Fuchsin-Jodgrün oder in Methylenblau-Safranin. Die Doppelfärbungen sind in Kanadabalsam haltbar.

Bismarckbraun (konz. wässer. Lös. [erhitzen, filtrieren] oder mit Alkoholzusatz) wird überwiegend allein benutzt, während Eosin zu Doppelfärbungen dient. Bei der Färbung mit Gentianaviolett (Methylviolett 5 B) kommen die mit Chromsäuregemischen fixierten Präparate auf einige Minuten in die Farblös. (1. Gentianaviolett, 3. Anilin, 15. Alkohol, 100. Wasser), dann Abspülen mit Alkohol, Nachbehandlung mit Jod bis zur Dunkelfärbung (1. J, 2. KJ, 300. Wasser), Auswaschen mit Alkohol, Nelkenöl, Kanadabalsam (Gramsches Verfahren, A. Zimmermann, Mikrot. 1892, 181). Wird dem Nelkenöl Eosin zugesetzt, dann erhält man Doppelfärbungen. Gentianaviolett-Eosin gebrauchte Oltmanns (Flora, 1895, LXXX, S. 388) bei mit 1 % Chroms. fixierten Vaucherien. — Eosin-Methylenblau (Mann), 5 Minuten in 1 % wässer. Eosinlös., dann 25 Minuten in 4 % wässer. Methylenblaulös., Abwaschen, abs. Alkohol, Xylol, Kanadabalsam. Plasma rot, Chromatin und Nukleolen dunkelblau. — Eosin-Hämatoxylin (O. Kaiser, Bot. Ztg., 1896, LIV, S. 66) ist nicht für Dauerpräparate.

Safranin-Gentianaviolett-Orange (sog. Dreifachfärbung Flemming[1]). Fixiert wird mit Osmiumgemischen. Bei Benutzung von Alkoholmaterial müssen die auf dem Objektträger befestigten Schnitte zunächst mit 1 % Chroms. 24 Stunden gebeizt und 2 Stunden in Wasser gelegt werden (Strasburger). Zuerst 1 bis 2 Tage alkoholische Safraninl.[2]), dann folgt nacheinander Abwaschen mit Alkohol, Säurealkohol (mit nur 0.1 % Salzs.), kurzes Abwaschen mit Wasser. Gentianaviolett[3]) (1/4—1 Stunde, auch länger), rasches Abwaschen mit Wasser, konz. wässer. Lös. von Orange G (Grübler) auf 2—4 Minuten (Abgabe blauer Farbwolken), Auswaschen in absol., ev. einigemale zu erneuerndem Alkohol, schließlich Nelkenöl, Kanadabalsam. Bei guter

[1]) W. Flemming, Neue Beiträge zur Kenntnis der Zelle, Arch. f. mikr. Anat., 1891, XXXVII, 249 u. 685 Anm. Vergl. ferner: H. v. Winiwarter u. G. Sainmont, Erfahrungen über die Flemmingsche Dreifärbung, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1908, XXV, 157. Dort wird mitgeteilt, daß die Safranine des Handels sehr ungleichwertig sind. Die besten Resultate geben (bei tierischen Geweben) Safranin Grübler 20, de Haën I, Schuchardt 0.

[2]) Nach P. Claussen (Ber. deutsch. bot. Ges., 1908, XXVI, 144): 0.1 g Safranin, 25 ccm 95 % Alkohol, 25 ccm Wasser, 5 ccm Anilinwasser (1 : 300).

[3]) 0.45 g Gentianaviolett, 60 ccm Wasser, 5 ccm Anilinwasser (1 : 300).

Dreifärbung müssen die Chromosomen purpurrot, die Nukleolen heller rot, die Spindelfasern hell violett gefärbt sein: Linin erscheint fast farblos.

Haematoxylinlösungen werden mit Eisenzusatz benutzt und auch mit Anilinfarben zu Doppelfärbungen vereint. — Für das Studium der Kernstruktur leistet nach den langjährigen Erfahrungen Strasburgers[1]) gute Dienste Fixierung mit Chromosmiumessigsäure und Färbung mit Eisenhämatoxylin (Grégoire)[2]). Die aufgeklebten Paraffinschnitte kommen auf $1^1/_2$ Stunden bei 52° in den Wärmeschrank, gelangen noch warm in Xylol, werden in Alkohol gewaschen und mit Wasser abgespült. Nun folgt einstündige Behandlung mit käuflichem Wasserstoffsuperoxyd bis zum Schwinden der Schwärzung, Auswaschen mit Wasser und einstündige Einwirkung einer 4 % Lösung von schwefelsaurem Eisenoxydammon. Alsdann wird mit Wasser abgespült und eine Stunde lang mit Hämatoxylin (Grübler) gefärbt. Schließlich werden die Schnitte nach vorangegangenem Abwaschen mit 4 % Eisenammonlösung unter mikroskopischer Kontrolle differenziert und kommen in Wasser, Alkohol, Nelkenöl, Kanadabalsam. Bei diesem und ähnlichen Verfahren wird mehrfach ein Nachfärben empfohlen, Tischler[3]) empfiehlt Säuregrün oder Lichtgrün, Overton[4]) Gentianaviolett.

Carminlösungen werden weniger gebraucht: Alauncarmin (Grenacher, Arch. f. mikr An., 1879, XVI, 465; 1 % wässer. Carminl. mit 1—5 % Kalialaun), Carmalaun (P. Mayer, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1899, XVI, 196: $^1/_2$ % wässer. Carminl. mit 5 % Alaun, haltbar gemacht durch 0.2 % Salizyls., Partsch, Arch. mikr. Anat., 1877, XIV, 180), Alauncochenille (nach Csokor, Arch. mikr. Anat., 1880, XVIII, 413: 7. Alaun, 70. Cochenille, 700. Wasser, durch Erhitzen auf 400, u. a. von R. Zander bei Milchsafthaaren benutzt, Bibl. bot., 1896), Boraxcarmin, (Grenacher; 2 % wässer. Carminl., 4. Borax, 100. Alkohol 70 %) u. a.

In Kürze seien einige Färbungsvorschriften für Bakterien, Hefe und Flechten angeführt:

Die Zellkerne der **Bakterien** hat A. Meyer (Zellkern d. Bakt., Flora, 1908 XCVIII, 335) aufgefunden und gefärbt (frühere Untersucher hatten Vakuolen, Volutin u. a. für Zellkerne gedeutet). Das mit Wasser abgekochte Material (Bac. Pasteurianus) kommt in schwefelsaures Eisenoxydammoniak ($^1/_2$ %, 24 Std), dann

[1]) E. Strasburger, Typische und allotypische Kernteilung. Jahrb. f. wiss. Bot. 1906, XLII, S. 8.

[2]) V. Grégoire et A. Wygaerts, Reconstr. d. noyau et formation d. chromosomes d. les cinèses somatiques, La Cellule, 1903, XXI, S. 7.

[3]) G. Tischler, Entwickl. d. Pollens u. d. Tapetenzell. b. Ribes-Hybrid., Jahrb. f. wiss. Bot., 1906, XLI, S. 549.

[4]) J. B. Overton, Reduktionsteilung i. d. Pollenmutterzell. einig. Dikotyl., Jahrb. f. wiss. Bot., 1906, XLI, S. 121.

in Hämatoxylinlös. (1 : 200, 24 Std.) und wird mit verd. Salzs. differenziert (5 Tropfen in 10 ccm Wasser). Man kann mit Flemming fixieren (1+1, 3 Std.), mit 20 % Alkohol härten, mit Delafield (1+1 Vol., 24 Std.) färben und mit Salzs.-Alkohol differenzieren oder: mit Flemming fixieren, mit 20 % Alkohol härten, mit Eisenhämatoxylin färben und mit Ferriammoniumsulfat unter Deckglas differenzieren. Die Trennung des Materials von den verschiedenen Flüssigkeiten wird durch Zentrifugieren bewirkt (S. 18).

Hefezellen (in Würze kräftig gezüchtet) werden gewaschen, dann nach H. Zikes (Fix. u. Färb. d. Hefen, Centrbl. Bakt., 1911, 2, XXXI, 507) mit konz. Sublimatlös. oder Chromessigs. fixiert (24 Std.), wiederum gewaschen (24 Std.) und je 4 Stunden lang in 25-, 50-, 75- und 96 % Alkohol gehärtet. Dann folgt Eisenalaun (2.5 g : 100 ccm Wasser, 4 Std.), Hämatoxylin (0.5 g : 100 ccm Wasser, 18 bis 24 Std.) und schließlich Differenzierung in 1 % Schwefels. Trennung der Hefe von den Flüssigkeiten durch Zentrifugieren.

Flechten fixiert W. Nienburg (Entwickl. einig. Flechtenapothecien, Flora, 1908, XCVIII, 1) mit 1 % Chromessigs. (12 Std., dann 24stünd. Auswaschung in fließend. Wasser) und färbt mit Hämatoxylin Heidenhain (mehrere Std.). „Als Gegenfärbung zur Deutlichmachung der Membranen wurde häufig Eosin benutzt“.

Es sei nochmals betont, daß im Vorstehenden nur die Vorschriften einiger Fixier- und Färbungsmittel gegeben und Literaturangaben meist fortgelassen werden mußten. Es muß auf die Spezialliteratur verwiesen werden (Lee, P. Mayer u. a.) und auf die Referate von E. Küster in der Ztschr. f. wiss. Mikr. Die Lösungen (oder die Tabletten hierzu) sind auch von Grübler, Kahlbaum u. a. zu beziehen.

Die Chromatophoren der höheren Pflanzen und ihre Farbstoffe.

Chromatophoren sind Organe des Protoplasten, welche entweder Farbstoffe führen oder Farbstoffe zu bilden befähigt sind. Es sind weiche (feste?) plasmatische Körper, die nur den Pilzen fehlen. Wir unterscheiden Leukoplasten, Chloroplasten und Chromoplasten (Schimper), die im Laufe ihrer Entwicklung ineinander übergehen können.

Leukoplasten (Fig. 104) sind farblose, meist kugelige Gebilde, aus denen die anderen Chromatophoren hervorgehen. In Reservestoffbehältern bleiben sie farblos und bilden aus gelösten Polysacchariden Stärke (Amyloplasten). Es sind zarte Gebilde; in Drogen und Herbarmaterial trifft man sie oft nicht mehr an. Zuweilen läßt sich an den Stärkekörnern die Stelle ihres Sitzes erkennen (flache Mulde, Iriswurzeln, Fig. 104). In Blattepidermen und Trichomen treten oft durch Rückbildung aus Chloroplasten entstandene Leukoplasten auf. Von den Leukoplasten (Orchis, Arum, Tradescantia, Galanthus u. a.) sagt Zacharias: „sie verquellen in verd. Salzsäure, Methylgrünessigsäure; desgleichen bis auf geringe Reste in Magensaft, 10 % Kochsalzlösung und

destilliertem Wasser. Sie färben sich in Methylenblau-Fuchsin S rot nach Behandlung mit verd. Salzsäure. Sie quellen nicht und färben sich blau in Glaubersalzmethylgrünessigsäure" (Lit. S. 418, 2).

Die Chloroplasten (Chlorophyllkörper) führen in einem farblosen Stroma einen grünen Farbstoff (Chlorophyll), der bei Algen oft durch andere Farbstoffe verdeckt ist. Die Chloroplasten der Algen sind Scheiben, Bänder, Sterne und nehmen einen großen Teil des Zelllumens ein. Bei höheren Pflanzen finden wir kleine rundliche oder linsenförmige Körner, Chlorophyllkörner (Fig. 105). — Die Chlorophyllbildung (das Ergrünen) ist von verschiedenen Faktoren abhängig (chemische Stoffe, S. 86 u. 123, günstige Temperatur, Luftsauerstoff, Lichtintensität u. a.). Die Lichtintensität kann sehr niedrig bemessen sein. Im allgemeinen geht die Fähigkeit, Chlorophyll bei Lichtabschluß zu bilden, mit der höheren Organisationsstufe der Pflanzen verloren. In den mit dem lebenden Plasma in Verbindung stehenden Chlorophyllkörnern vollzieht sich die Photosynthese (S. 66, 133 u. 181). Bei den saccharophyllen Pflanzen werden die Hexosen ständig abgeleitet, gewöhnlich erfolgt aber eine Überführung dieser in Stärke; es entstehen in den Chlorophyllkörnern kleine Stärkekörnchen (Stärkeeinschlüsse, s. d.). Dadurch werden Störungen im Assimilationsprozeß vermieden, die Konzentration des Zellsaftes nimmt ab u. a. In der Nacht wird die Assimilationsstärke abgeleitet, am frühen Morgen sind die Blätter stärkefrei.

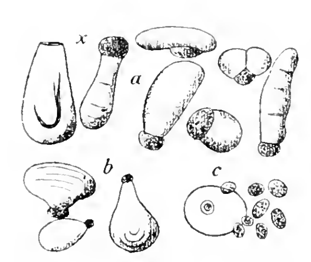


Fig. 104. Leukoplasten an Stärkekörnern. a) Iris germanica (Rhizom, bei x Leukoplast zugrunde gegangen), b) Ferula spec. (Wurzel). c) Leukoplasten am Zellkern. Orchis spec. (Knospenblatt) (Tunmann).

Chromoplasten führen gelbe bis rotgelbe Farbstoffe (Xanthocarotine) und entstehen entweder aus Leukoplasten (in unterirdischen Organen, Daucus) oder, wie bei der Reife der Früchte, in und an sich zersetzenden Chlorophyllkörnern. In Pflanzen wärmerer Länder treten Chromoplasten auch in vegetativen Organen auf (W. Rothert, Bull. Ac. Cracovie, 1912, 189). Bei der Ernährung spielen sie keine Rolle. Die Carotinbildung in Früchten ist ein Prozeß, der normalerweise bedingt wird durch abgeschlossenes Wachstum, Aufhören der Ernährung und Zersetzung des Chlorophylls. In Daucus wächst der Gehalt an Carotin umgekehrt proportional dem an Chlorophyll, proportional dem an Stärke und Zucker (F. u. G. Tobler). Bei der enzymreichen Monilia sitophila betrachtet Went reichliche Carotinbildung als Schutz für die Enzyme (Rec. trav. bot. Néerl., 1904, I, S. 106). Die Bildung des Carotins (Hämatochrom) bei Trentepohlia hängt von der Feuchtigkeit ab. Bei Trockenheit vermehrt sich der Farbstoff, füllt den ganzen Zellinhalt aus und verdeckt die Chromoplasten (K. Meyer, Lebensgesch. d. T. umbrina Mart., Bot. Ztg., 1909, LXVII, S. 25). Die Chromoplasten bedingen die grellen Lockfarben der Blüten und Früchte. Orange- bis carminrote Chromoplasten finden sich in Caps. ann., Convall. majal., Lycopers. escul., Asparag. off., Crataeg., Rosa (Hypanthien), Evonymus, Myristica, Taxus (Arillus). Gelbe Chromoplasten kommen vor in vielen Blüten (Verbascum, Calendula, Matricaria, Gentiana, Cheiranthus, in den Blütenhaaren der Cucurbitaceen) und in Früchten (Aurantiaceen).

Rote und rotbraune „unregelmäßig klumpige oder lappige Gebilde", die den Chromatophoren nahestehen sollen, hat A. Schlockow (Anat. d. braun. Blüt., Diss. Heidelberg, 1903, S. 22) in den braunen Blüten von Oncidium sphacelatum aufgefunden und sagt, daß sie „weder in kaltem noch in heißem Wasser löslich sind, daß sie weder von kaltem noch von heißem Alkohol, noch von kalter oder heißer Salzsäure angegriffen werden, daß sie dagegen von Natronlauge und von Ammoniak schon in der Kälte leicht gelöst werden. Hierbei verschwindet aus ihnen zuerst der rote Farbstoff und es hinterbleibt ein farbloses Bläschen."

Anfangs nahm man an, daß die Chromatophoren durch Neubildung aus dem Zellplasma entständen (Mikosch) und sich dann durch Teilung vermehren. Da sich aber sehr kleine Leukoplasten schon in der Eizelle und in den Vegetationspunkten vorfanden, so vertrat man (Schmitz, Schimper, A. Meyer) bis vor kurzem allgemein die Ansicht, daß sich sämtliche Chromatophoren einer Pflanze nur von den Leukoplasten der Eizelle ableiten und diese wiederum von der Mutterpflanze. Von verschiedener Seite wurde hiergegen Einspruch erhoben, Eberdt (Jahrb. wiss. Bot., 1891, XXII, 293) kam zu dem Ergebnis, „daß die Schimperschen Stärkebildner nicht schon in den Zellen des Vegetationspunktes vorhanden sind", und in neuester Zeit ist man der alten Auffassung wieder näher getreten.

Die Chromatophoren sollen aus den festeren Teilen des Cytoplasmas hervorgehen, aus Chondriosomen, die das Cytoplasmagerüst bilden (die Chondriosomen sollen den Mitochondrien der Tierzelle homolog sein). Diese Jugendstadien wurden schon von K. Mikosch (Sitzb. Wien. Ak., 1878) bei Allium, Galanthus u. a. beschrieben, sind identisch mit den Granulis von Zimmermann, und in neuerer Zeit eingehend studiert von Pensa, Guilliermond, Forenbacher (Tradesc. virg.), H. Lundegård (Wurzelspitzen, Vicia), Lewitsky[1]) (Helodea) u. a. Zum Fixieren wird Bendasche Flüssigkeit (15 ccm $^1/_2$% Chromsäure, 3—4 ccm 2% Osmiumsäure, ohne Eisessig!), zum Färben Safranin-Gentianaviolett-Orange oder Eisenhämatoxylin (Heidenhain-Mewes) benutzt. Lewitsky teilt die Fixierungsmittel in „chondriosomenerhaltende" und „chondriosomenzerstörende" ein. Zu ersteren zählen außer der Bendaschen Mischung noch 10% Formalin, $^1/_2$% Osmiumsäure, schwaches Flemmingsches Gemisch, Altmannsches Gemisch (gleiche Teile 5% Kaliumdichromat und 2% Osmiumsäure).

Es ist aber noch fraglich, ob die Chondriosomen die verschiedenen Entwicklungsstadien der Chromatophoren darstellen, wie Schmidt[2]) meint, ja ob sie überhaupt sämtlich mit den Chromatophoren in Zusammenhang stehen. Selbst in ausgewachsenen Zellen finden wir neben

[1]) A. Forenbacher, D. Chondriosomen als Chromatophorenbildner, Ber. d. bot. Ges., 1911, XXIX, 648; G. Lewitsky, Vergl. Unters. üb. d. Chondriosomen in leb. u. fix. Pflanzenzell., Ber. d. bot. Ges., 1911, XXIX, 685.

[2]) E. W. Schmidt, Pflanzliche Mitochondrien, Progress. rei bot., 1912, IV, S. 163 u.: Neuere Arb. über pfl. Mitochond., Ztschr. f. Bot., 1912, IV, S. 707.

voll entwickelten Chlorophyllkörnern auch Chondriosomen, sowohl in Körnern (Mitochondrien) als auch in Fäden (Chondriomiten) und in Stäbchen (Chondriokonten). Sie lassen sich an geeigneten Präparaten (Aristolochien, Strychnos) durch Jodjodkalium kenntlich machen, scheinen aber doch nicht im Chemismus übereinzustimmen. Bei Strychnos lösen sie sich in verd. Mineralsäuren (1—3%), aber nicht bei Asparagus und Vicia faba. Sicher ist nur die plasmatische Natur dieser Bildungen, zu denen vielleicht die Nematoplasten Zimmermanns (Bot. Centrbl., 1893, Beih.), die Karyoide Pallas (Ber. d. bot. Ges., 1894, XII, S. 153) und die Vibrioiden von Swingle und Lagerheim (Svensk. Vet.-Ak., 1896, Nr. 6) ebenfalls gehören.

Zum Studium der feineren Struktur der Chromatophoren ist die Beobachtung lebenden Materials erforderlich. Dabei müssen alle Faktoren ausgeschaltet werden, die das Leben der Protoplasten und der Chromatophoren schädigen. Man wählt zur Beobachtung stärkere Präparate (wenn geeignet Trichome oder dünne Blätter) und beobachtet sofort in Rohrzuckerlösung (2—5%). Zimmermann injiziert Pflanzenteile unter der Luftpumpe mit Zuckerlösung, um gleichzeitig die Luft aus den Interzellularen zu entfernen. Meist genügt direktes Eintragen in die auf dem Objektträger befindliche Lösung. Ein Eintragen in Wasser ist im allgemeinen zu vermeiden. Die Chlorophyllkörner sind sehr empfindliche Gebilde, die meist schon in Wasser quellen und sich mehr oder weniger vollständig zersetzen. Die Körner von Hedera helix, Malpighia coccigera, Taxus bacc. u. a. sind gegen Wasser widerstandsfähig. Die Widerstandsfähigkeit hängt nicht mit den Altersstadien der Körner zusammen, teils sind die Körner jüngerer Blätter resistenter (Dammara robusta, Hedera helix), teils die älterer Blätter (Araucaria, Taxus bacc., Abies pect.)[1].

Die Chloroplasten der allermeisten Pflanzen werden selbst bei Beachtung aller erforderlichen Vorsichtsmaßregeln nur als homogen gefärbte Gebilde erscheinen, in denen Einschlüsse (meist Stärke, dann Öltropfen, Proteinkristalloide u. a.) zugegen sind. Wir nehmen aber gegenwärtig einen schwammartigen Aufbau an. In den Maschenräumen des farblosen Stromas sind kleine grüne Körnchen „Grana“ eingelagert. Dieser Aufbau läßt sich nur an geeigneten Objekten mit einiger Sicherheit feststellen, so an den Chloroplasten der grünen Knollen von Acanthephippium sitchense, Pellionia, Phajus, des Stengelparenchyms von Goodyera discolor, der Blätter von Mnium cuspidatum u. a. Ob die

[1]) H. Bredow, Beitr. z. Kenntn. d. Chromatoph., Jahrb. f. wiss. Bot., 1891, XXII, S. 347. — V. Vouk, Laubfarbe u. Chromoplastenbild. b. immergr. Holzgew., Sitzb. Wien. Ak., 1908, CXVII, 1, S. 1337.

einzelnen Körner mit einer (farblosen) Membran umgeben sind, ist strittig. A. Meyer, Schmitz u. a. verneinen das Vorhandensein einer Membran: Fr. Schwarz, Bredow, Tschirch, Kny treten für eine Membran ein, ebenso Czapek (aus theoretischen Gründen). Küster[1]) hält sie für ein Kunstprodukt (Fig. 105). Für eine Membran spricht der Befund, daß die einzelnen Körner in der lebenden Zelle selbst bei dichter Lagerung nicht miteinander verschmelzen[2]). Senn[3]) tritt für eine Hülle (Peristromium) ein. Fortsätze des Peristromiums, „Pseudopodien", befähigen die Chloroplasten zu aktiven Bewegungen. Ohne Reagentien sind diese Verhältnisse an Funaria hygrometrica sichtbar. Die Pseudopodien der einzelnen Körner stehen untereinander in Verbindung und bilden eine Netzstruktur (Fig. 105b u. c), die freilich von anderer Seite als zum Grundplasma gehörig betrachtet wird. An Leukoplasten wurden Pseudopodien bei verschiedenen Orchideen (Listera ovata, Blattunterseite, Orchis latif., Epidermiszellen, O. incar.) studiert. Sie gehören der Chromatophorenmasse selbst an, veranlassen amöboide Formveränderungen, tragen aber zur Ortsveränderung wenig bei. Die Formveränderung wird besonders bei Zusatz wasserentziehender Lösungen deutlich. Epidermispräparate werden in n-Rohrzucker, n-Kalium- oder Kalziumnitrat gelegt, die Lösungen bei Eintritt der Wirkung mit Wasser wieder ausgewaschen (Küster).

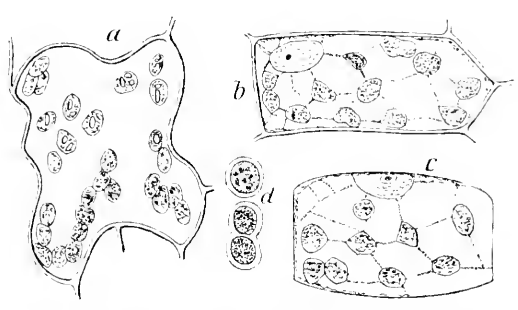


Fig. 105. Chlorophyllkörner jugendlicher Organe. *a*) Adiantum capillus veneris (Zuckerlös.), *b*) Strychnos nux vom. (Osmiumdampf, verd. Alkohol), *c*) Strychnos (Jodjodkalium. verd. Alkohol) (Tunmann); *d*) Podocarpus lacta (mit Randzone, Degenerationserscheinung, nach Vouk).

Wie zuerst Rosanoff bei Bryopsis fand, und Schimper bei Anthoceros sowie Haberlandt[4]) bei Selaginella beobachteten, zeigen

[1]) E. Küster, Über amöboide Formveränderungen der Chromatophoren höherer Pflanzen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1911, XXIX, S. 362.

[2]) Bei niedriger Temperatur beobachtete G. Haberlandt eine Fusion der Chlorophyllkörner (Über den Einfluß des Frostes auf die Chlorophyllkörner, Öst. bot. Ztschr., 1876, XXVI, S. 249).

[3]) G. Senn, Die Gestalts- u. Lageveränderung d. Pflanzenchromatophoren, Leipzig 1908.

[4]) G. Haberlandt, Flora 1888, u. Phys. Pflanzenanat., 1904, III. Aufl., S. 238.

die Chloroplasten dieser Pflanzen bei Wasserzutritt eine krummradiale Streifung; doch ist diese Erscheinung noch nicht näher aufgeklärt.

Von den Chloroplasten sagt Zacharias (Lit. S. 418, 2), sie „werden bis auf beträchtlichere Reste vom Magensaft gelöst. Die Verdauungsreste quellen nicht in 10% Kochsalzlösung".

Beim Studium erwachsener Chromatophoren stehen Fixierung und Färbung an zweiter Stelle und werden weniger zu Strukturstudien als zur Sichtbarmachung äußerst kleiner Leukoplasten und zum Auffinden von Chloroplasten in panachierten Blättern benutzt. Derartige Fälle sind relativ selten, denn überwiegend sind sie ohne weiteres als scharf abgegrenzte Gebilde selbst in chlorotischen Geweben bei scharfer Beobachtung gut zu erkennen. Bei dem überaus weichen Stroma muß auch hier ganz besonders auf die Fixierungsmittel geachtet werden und Vergleiche mit lebendem Material sind unerläßlich; erst in jüngster Zeit wurde die von Senn betonte „Sterngestalt" fixierter Chloroplasten von Knoll[1]) als ein Kunstprodukt angesprochen, entstanden durch schlechte Fixierung mit heißem Alkohol.

Zum Fixieren benutzt man gesättigte Lösungen von Sublimat oder Pikrinsäure in abs. Alkohol (Einwirkung 24 Stunden, Auswaschen in fließendem Wasser), zuweilen siedendes Wasser (Zimmermann, Mikrot., S. 197), auch Jodjodkalium. Senn fixiert Blattstücke mit siedendem Alkohol oder Sublimatalkohol. Gute Erfolge liefert Osmiumsäure mit Alkoholbehandlung nach Lidforss[2]). Feine Freihandschnitte (Haemanthus cocc., Epidermis) werden mit der Pinzette 5—15 Sekunden dicht über 2% Osmiumsäure gehalten und sofort in 10% Alkohol, dann nacheinander in Alkohol übertragen, der um 5% stärker ist, bis sie in absoluten Alkohol gelangen. In jeder Flüssigkeit bleiben sie 2—5 Minuten. Nach 12 Stunden erfolgt die Übertragung der Schnitte in immer schwächeren Alkohol, schließlich in Wasser, dann folgt Färbung nach Zimmermann, Einschließen in Glyzeringelatine oder Kanadabalsam. Die kinoplasmatischen Verbindungsfäden zwischen Kern und Chromatophoren sind nun deutlich gefärbt. Kontraktionen des Stromas sind bei keinem Verfahren völlig ausgeschlossen.

Zur Färbung benutzt man eine 0.2% wässer. Lösung von Säurefuchsin (5—20 Min., dann sofort mit fließendem Wasser abwaschen) oder eine konz. wässer. Lösung von Jodgrün (1—2 Min. Abspülen mit Wasser, Glyzerin). Bei Dauerpräparaten erfolgt nach der Färbung

---

[1]) Fr. Knoll, Netzartige Protoplasmadiff. u. Chloroplastenbew., Sitzber. Wien. Ak., 1908, CXVII1, 1227.

[2]) B. Lidforss, Über kinoplasmat. Verbindungsfäden zwischen Kern und Chromatophoren, Lunds Univ. Arsskrift, 1908, N. F. Afd. 2, IV.

und dem Abwaschen erst Austrocknen, dann Xylol, Kanadabalsam (Zimmermann, Ztschr. wiss. Mikr., 1890, VII, 6). Senn setzt dem Säurefuchsin etwas Jodalkohol zu, überfärbt stark und differenziert mit einer gesättigten Lösung von Jod in Alkohol (30 %), so daß nur Chromatophor und Zellkern gefärbt bleiben.

H. Fischer (Lit. S. 197_3) benutzt Farben, welche die Stärkesubstanz farblos lassen (Anilinblau, Kongorot, Cyanin, Nigrosin a. a.), Schimper Gentianaviolett und Haematoxylin, J. H. Salter (Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXII, 116) Methylviolett, S. Prowazek 2 % Gentianaviolett (Fixierung 1 % Chromessigsäure, Öst. bot. Ztg., 1900, L, 69), E. Pantanelli (Malpighia 1902, XV, 363) wäscht mit Salzsäure-Wasser aus. E. Heinricher (Cohns Beitr., 1895, VII) fixiert die sich leicht zersetzenden Leukoplasten der Schuppenwurz mit siedendem Wasser und färbt mit Methylenblau.

Werden die Plastiden durch Stärke zu sehr verdeckt, so muß man (nach Fixierung) die Stärke zum Quellen bringen: bei Euglenen wird Paramylon durch 10 % Kalilauge zur Quellung gebracht. H. Zumstein (Morph. und Phys. d. Eugl. grac., Jahrb. f. wiss. Bot., 1909, XXXIV, 149).

Die Farbstoffe der Chromatophoren.

Der Chlorophyllfarbstoff ist meist nur in den Chlorophyllkörnern lebender Zellen in rein grüner Farbe zu sehen. Bei getrocknetem Material werden die Chlorophyllkörner, die dann zuweilen zu formlosen Klumpen zusammengeballt sind, eine mehr bräunliche Färbung besitzen, da, vorzüglich bei langsamem Trocknen, die Pflanzensäuren aus dem Chlorophyllgrün Hypochlorin (s. unten) bilden. Wenn wir einen Blattquerschnitt (frisches Material) mit Alkohol (Äther, Petroläther, Schwefelkohlenstoff, fetten und ätherischen Ölen) auswaschen, dann entfärben sich die Chlorophyllkörner und grüne Streifen fließen ab. In dem abfließenden Alkoholauszug ist der Chlorophyllfarbstoff enthalten, der vereinzelt auch im Tierreich (Locustiden, Rana) vorkommt. In den Blättern kommt im allgemeinen 0,5—1,0 % der Trockensubstanz auf das Chlorophyll. Im Ultramikroskop erscheint Chlorophyll rot und grün. Die grüne Färbung ist eine Folge der Beugungserscheinung. Der Farbstoff ist eine Mischfarbe. Beim Schütteln des alkoholischen Auszuges mit Benzol u. a. findet eine Trennung in einen grünen Anteil (Chlorophyllgrün) und in einen gelben (Xanthophyll und Carotin) statt.

Chlorophyllgrün.

Die Konstitution des Chlorophyllgrüns ist noch unbekannt. Eisen fehlt, die Gegenwart von Phosphor ist strittig (S. 86), hingegen ist Magnesium, gebunden an die stickstoffhaltigen Gruppen, zugegen. Dem Magnesium werden ähnliche katalytische Wirkungen zugeschrieben wie dem Eisen im Blute, jedoch mit dem fundamentalen Unterschiede, daß die komplexen organischen Magnesiumverbindungen des Chlorophylls Substanzen aufbauen, während die Eisenverbindungen

des Blutes die Körper zerlegen. Die Chemie ist in der chemischen Literatur zu ersehen, die neueren Arbeiten Willstätters erscheinen in Liebigs Annalen, die neue Lit. s. bei Czapek, Ztschr. f. Bot., 1911, III, S. 43.

Zum mikrochemischen Nachweis des Chlorophyllgrüns dienen nachstehende Methoden: Die Hypochlorin- oder Chlorophyllanreaktion[1]) kann man mit Salzsäure (1 + 4 Wasser) oder mit Eisessig ausführen. Zu Präparaten lebenden Materials wird unter Deckglas Eisessig gebracht. Innerhalb weniger Minuten treten aus den Chlorophyllkörnern große Tropfen aus, die eine gelbgrüne Flüssigkeit bilden, aus welcher größere und kleinere braune Hypochlorinkristalle anschießen (Fig. 106). Gleichzeitig entfärbt sich die Flüssigkeit. Die Reagentien dürfen nicht im Überschuß zugesetzt werden. Durch Erhitzen bis nahe zum Sieden lassen sich die aus Eisessig erhaltenen Kristalle umkristallisieren und es entstehen dann meist Drusen gerader Nadeln (Fig. 107). Die Kristalle lösen sich in Rizinusöl (beim Erhitzen), Chloroform, Äther, Petroläther (langsam), wässerigem Chloralhydrat (bis auf ein in Alkohol lösliches Tröpfchen), Alkohol (langsam), Eisessig (in der Kälte kaum, heiß leicht). Osmiumsäure härtet sie innerhalb 24 Stunden derart, daß sie in Chloral, Äther, Alkohol unlöslich werden. Kalilauge löst sie nicht (A. Meyer, Lit. S. 33, 1). Schöne Hypochlorinkristalle erhält man, wenn man die mit Petroläther befeuchteten Präparate unter Deckglas einige Tage in einem mit Petrolätherdämpfen gesättigten Raume liegen läßt.



Fig. 106. Hypochlorinkristalle (Adiantum capillus veneris, Epidermis), mit Eisessig erhalten (Tunmann).

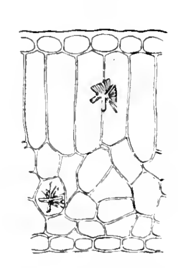


Fig. 107. Hypochlorinkristalle mit heißer Essigsäure in Mentha piperita, Blattquerschnitt (Tunmann).

Die Reaktion läßt sich auch mit Wasserstoffsuperoxyd, Ferrocyankalium (M. Tswett, Arch. sc. phys. nat., 1896, CI, 336) und mit einer gesättigten Kalilauge ausführen (Lit. S. 173, 4). Die Kalilauge führt die grüne Farbe des Chlorophylls sofort in Braun über. Nach 2—30 Min. (beim Erhitzen sofort) geht die braune Färbung in Grün zurück. Das gleiche Resultat bewirkt Zusatz von Wasser, weniger schnell wirkt Äther, Alkohol, Glyzerin. Die Präparate dürfen zuvor nicht mit Wasser benetzt werden. Bei Cyanophyceen und Florideen erfolgt diese Hypochlorinreaktion nur undeut-

[1]) N. Pringsheim, Lichtwirk. u. Chlorophyllfunkt., Jahrb. f. wiss. Bot., 1879, XII, 288.

lich, bei Diatomeen und Phaeophyceen erst nach Vorbehandlung mit siedendem Wasser.

Bei der Chloroglobin-Reaktion[1]) dient eine konz. Lösung von Resorcin (10 + 10): diese löst das Cytoplasma, während die Chloroplasten unter Abscheidung grüner Tröpfchen zu halbflüssigen Massen zusammenfließen. Benutzt man eine durch Ammoniak alkalisch gemachte Resorcinlösung, dann werden auch die Chloroplasten gelöst und der Farbstoff aller Chloroplasten einer Zelle fließt in großen Tropfen zusammen (Chloroglobin). Wird Chloroglobin mit Wasser oder Glyzerin ausgewaschen, so ballt es sich zu Klumpen zusammen, die durch Eau de Javelle entfärbt werden und dann Methylenblau, Cyanin, Jodgrün, Fuchsin und Chrysoidin speichern, aber keine Eiweißreaktionen geben.

Xanthocarotine.

Unter Xanthocarotine (Tschirch) fassen wir die gelben (Xanthophylle) und roten (Carotine) Farbstoffe zusammen (die Beziehungen zu den Plastiden haben), zumal auf mikrochemischem Wege eine Trennung der Carotine von den Xanthophyllen nicht mit Sicherheit gelingt. Die Xanthocarotine bilden mit den Lipochromen (S. 407) die biologische Gruppe der Carotinoide von Tswett. Wheldale (R. Soc. Proc., 1909, LXXXI, S. 44) unterscheidet zwischen Carotin und Xanthin (nur an Chromatophoren gebunden) und Xanthein (im Zellsaft gelöst).

Die Carotine[2]) sind Kohlenwasserstoffe ($C_{40}H_{56}$). Das Carotin von Daucus ist dem Lycopin von Lycopersicum isomer. Die Xanthophylle sind wahrscheinlich Oxydationsprodukte der Carotine ($C_{40}H_{56}O$). Mikroskopische Angaben über reine Präparate dieser Körper liegen von R. Willstätter und H. Escher vor (Farbst. d. Tomate, Ztschr. phys. Chem., 1910, LXIV, 47). Carotin und Xanthophyll bilden metallisch glitzernde Kristalle mit großer Fläche, Lycopin bildet braunrote Flocken dünner Kristalle (Prismen und haarfeine Nadeln). Carotin ist orangerot bis rot, Xanthophyll gelb, nur wenn sich mehrere Kristalle überdecken, rot. Lycopinkristalle sind bräunlich-rosa bis karminrot, an den Überdeckungsstellen blaustichig rot. Mit Schwefelsäure geben Carotin und Lycopin tief indigoblaue Lösungen, in Schwefelkohlenstoff löst sich Carotin gelbstichig rot, Lycopin blaustichig rot. Letzteres ist in Alkohol und Äther weit schwerer löslich als Carotin und Xanthophyll.

Die Xanthocarotine treten in den Chromoplasten teils amorph, teils in kristallinischer Form auf. Überwiegend sind sie entweder nur amorph oder nur kristallinisch. Selten kommen Grana (amorph) neben

[1]) M. Tswett, Das Chloroglobin, Bot. Centralbl., 1900, LXXXI, S. 81.

[2]) Im Perikarp von Momordica balsamina sind drei verschiedene Carotine zugegen; vergl. die Arbeiten von F. und G. Tobler in den Ber. d. bot. Ges., 1910, XXVIII — 1912, XXX, sowie C. van Wisselingh, Over het aantoonen van carotinoiden in de plant, Ak. Wet. Amsterd., 1912, S. 370.

Kristallen in den gleichen Chromoplasten vor (Lycopersicum, Sol. dulcamara). Die Farbstoffkristalle zeichnen sich durch starken Pleochroismus aus, sind tafel-, stäbchen-, spindel-, sichel-, nadelförmig und beeinflussen mehr oder weniger die Gestalt der Chromoplasten. Sie sind teils zu mehreren, teils einzeln dem Stroma eingelagert. Letztere können so stark heranwachsen, daß sie das Stroma bis auf geringe Reste verdrängen. Doch führen sie immer eine protoplasmatische Grundlage und sind von einem plasmatischen Häutchen umschlossen (Fig. 108). Bei der Auswanderung der nutzbaren Stoffe aus den Blättern im Herbst, beim Vergilben des Laubes, zersetzen sich die Chlorophyllkörner. Das Chlorophyllgrün wandert in den Stamm zurück (S. 121). Die Xanthocarotine verbleiben im Blatte, überwiegend in Gestalt kleiner Tröpfchen; zuweilen kommt es aber zur Kristallbildung (Fig. 108f), sehr oft in Conium (O. Tunmann, Pharm. Ztg., 1905, L. S. 1055). Die in der Zelle auftretenden Kristalle sind direkt mit Reagentien nachweisbar.



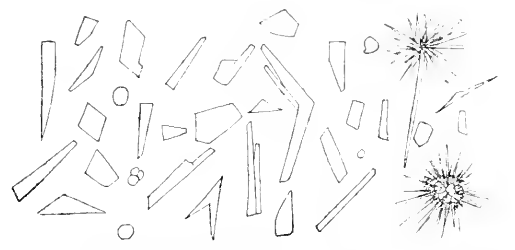
Fig. 108. Chromatophoren aus: a) Daucus carota, b) Sorbus aucuparia, c) Crataegus coccinea, d) Capsicum annuum, e) Citrus vulgaris; f) Xanthocarotinkristalle, aus Chloroplasten vergilbender Herbstblätter von Conium maculatum entstehend (Tunmann).

In den Chloroplasten sind die Xanthocarotine im Chlorophyllfarbstoff durch das Chlorophyllgrün verdeckt und müssen zunächst durch eine der nachstehenden Methoden zur Abscheidung gebracht werden.

1. Die Kalimethode (Lit. S. 173,4): Man legt frische grüne Blätter (besser Blattstücke) in alkoholische Kalilauge (20,0 Kaliumhydroxyd, 80,0 Alkohol, 40%) und beläßt sie in vor Licht geschützten und gut verschlossenen Gefäßen (um die Kohlensäure der Luft auszuschalten) mehrere Tage bis alles Chlorophyll ausgezogen ist. Xanthocarotin ist im Gewebe verblieben. Die Pflanzenstücke werden nun mit destill. Wasser gut ausgewaschen (etwa 12 Std.) und gelangen auf 1—2 Tage in Glyzerin. Die Präparate zeigen in den ursprünglich chlorophyllhaltigen Zellen das Carotin in Kristallform. Es sind orangegelbe bis braunrote, perlmutterglänzende Kristalle (einzelne Nadeln, stern- und büschelförmige Gruppen, Tafeln, Schuppen, (Fig. 109), die dem rhombischen und monoklinen, vielleicht auch dem triklinen System angehören (Becke). Die verschiedenen Kristallformen weisen bereits darauf hin, daß neben Carotin auch Xanthophylle zur Kristallisation gelangt sind. In einzelnen Fällen hat Molisch nur gelbe Tröpfchen

erhalten. Diese Ausnahmen erklärt Rywosch (Lit. S. 170, 1) mit der größeren und kleineren Menge des im Blatte vorhandenen Öles. Ist wenig Öl vorhanden, dann kristallisieren die Farbstoffe aus. Bei Gegenwart größerer Mengen Öles werden die Farbstoffe vom Öle aufgenommen. Nach Rywosch steigt der Gehalt des „Öles" mit dem Alter des Blattes und so erhielt er bei jungen Blättern Kristalle, bei alten Blättern der gleichen Pflanze meist Tröpfchen, erstere orangefarben, letztere immer gelb. Sollte das „Öl" von der Kalilauge nicht angegriffen werden?

Die Kalimethode kann auch bei Algen zur Anwendung kommen, doch scheiden sich die Xanthocarotine auf der Oberfläche der Zellen ab (F. G. Kohl, Lit. S. 173, 2). Bei Florideen wurde die Methode von H. Kylin erprobt (Ztschr. phys. Chem., 1911, LXXIV, 105), der Carotin auch makrochemisch aus Ceramium rubr. darstellte.


Fig. 109. Xanthocarotinkristalle, mit alkohol. Kalilauge aus Blättern erhalten (Tunmann).

2. Die Säuremethode von Frank-Tschirch. Grüne Blattstücke zeigen nach längerem Verweilen in verd. wässer. Säurelösungen und nachfolgendem Auswaschen mit Wasser rotviolette oder rötliche Kristalle (Carotin) und gelbrote ölartige Massen (Xanthophylle?). Mit diesem Verfahren hat Tammes[1]) die Verbreitung des Carotins im Pflanzenreiche verfolgt und 1—10 % wässer. Lösungen von Weinsäure, Oxalsäure, Salzsäure, ferner 1 % Chromsäure, 1—2 % Fluorwasserstoffsäure u. a. benutzt. Oft genügt bereits eine mehrstündige Einwirkung der Säuren, stets sind die Kristalle nach 2tägiger Säurebehandlung der Blätter gebildet. Nach Tswett[2]) ist Aufhellen der Blattstücke mit konz. wässer. Rezorcinlösung zu empfehlen. Neben den Kristallen treten noch dunkelbraune Massen hervor. Folgt auf die Säurebehandlung eine mehrtägige Kalibehandlung, so werden die braunen Massen gelöst und es verbleiben in den Zellen nur rote Kristalle und gelbe Tröpfchen.

3. Bei der Resorcin-Methode von Tswett (Lit. S. 469, 1) gelangen die Stücke in eine konz. wässer. Resorcinlösung (10 + 10), wodurch

[1]) A. Tschirch, Unters. üb. d. Chlorophyll, 1884, S. 92 u.: Tine Tammes, Vorkommen d. Carotins i. Pflanzenr., Flora, 1900, LXXXVII, S. 205.

[2]) M. Tswett, Üb. d. makro- und mikrochemischen Nachweis des Carotins, Ber. deutsch. bot. Ges., 1911, XXIX, S. 630.

Lipoide und plasmatische Proteinsubstanzen gelöst werden. Bei Zusatz von 1% zweibasischem Kaliumphosphat entstehen Chloroglobinkugeln, in neutraler Lösung bilden sich nach wenigen Minuten, in alkalischer Lösung nach längerer Zeit. gelbe Kristallbüschel und rote Kristalle.

Bei am gleichen Material (Adiantum, Strychnos, Hedera u. a.) ausgeführten Vergleichsversuchen erwies sich die Kalimethode am sichersten (Fig. 109). Die kristallinische Natur der Ausscheidungen tritt zuweilen erst nach gründlichem Auswaschen mit Wasser klar hervor (polarisiertes Licht, in dem die Kristalle gelb bis braunrötlich aufleuchten, ist zu empfehlen).

Bei den nativ auftretenden und bei den nach den genannten Methoden abgeschiedenen Xanthocarotinkristallen dienen zur Charakteristik folgende Reaktionen: Zur Erzielung scharfer Reaktionen müssen die Präparate zuvor mit Fließpapier gut abgetrocknet oder völlig ausgetrocknet (Exsikkator) werden. Konz. (nicht wasserhaltige!) Schwefelsäure[1]) färbt violett, dann indigoblau; aus der Lösung fallen bei Wasserzusatz grünliche Flocken. In Jodchloral (5 + 2 Wasser, Jod im Überschuß) werden die Kristalle schmutzig-grün. Phenol- und Thymolsalzsäure (konz. Säure mit etwas Phenol) färben tiefblau. Brom- oder Chlorwasser (Bromdämpfe), konz. Salpetersäure färben vorübergehend blau. Die Kristalle sind leicht löslich in Benzol, Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, fetten und ätherischen Ölen, unlöslich in Wasser, verd. Säuren, Alkalien und Glyzerin, fast unlöslich in Alkohol, sowie unlöslich in Eisessig und Chloralhydrat. Sie lösen sich aber in den drei letztgenannten Reagentien beim Erwärmen. Die Schwefelkohlenstofflösung ist blutrot, die übrigen Lösungen erscheinen gelb bis orange. Verwechslungen mit Phytosterinkristallen sind leicht zu erkennen. Phytosterin wird mit Schwefelsäure blutrot. „Entfärbt man die Kristalle, indem man kleine kristallführende Gewebestücke für 1—3 Minuten in Bromwasser einlegt, wäscht man dann aus und behandelt die nunmehr farblosen Kristalle mit konz. Schwefelsäure, so tritt keine Färbung ein" (Molisch: bei Carotinen), während Phytosterinkristalle selbst nach mehrtägigem Liegen in Bromwasser bei Zusatz von Schwefelsäure blutrot werden. So sollen die im Innern des Pollens von Verbascum thapsiforme sich nach mehrtägiger Glyzerinbehandlung ausscheidenden orangeroten Kristalle Phytosterin oder Fett sein[2]).

[1]) Das Verhalten der Kristalle in Schwefelsäure verschiedener Konzentration wurde von Borodin studiert (Mélang. biol., Bull. Ac. St. Pétersb., 1883, XI, 485), die allgemeinen Reaktionen besonders von A. Arnaud (Compt. rend., 1886, CII, 1119 u. 1889, CIX, 911), A. Meyer, Kohl u. a.

[2]) G. Poirault et G. Bertrand, Mat. col. d. poll., Compt. r., 1892, CXV, 828.

Zuweilen findet man in Chlorophyllkörnern neben Chlorophyll rötliche Carotintröpfen (fertile Sprosse von Equisetum arvens. u. limos., Selaginellen und in Tropenpflanzen, W. Rothert, Lit. S. 462). Durch starke Belichtung kann bei Aloe Carotinbildung erzeugt werden. Bei Verdunkelung der rotbraunen Blätter erfolgt Rückbildung in Chlorophyll. Die Rotfärbung der Aloeblüten führt Schimper[1] auf Carotine, Crouchet auf noch unbekannte Farbstoffe zurück. Ob in den Wurzeln von Dracaena, Sanseviera und anderen Liliaceen Carotin auftritt, wie Schmied[2]) aus dem Vorkommen rubinroter Tröpfchen folgert, muß noch ermittelt werden. Bei der Kalimethode entstehen körnige Ausscheidungen, mit Salzsäure-Phenol tritt keine Blaufärbung ein.

Die Sekretzellen von Rehmannia, die den Blättern mattrote Punkte verleihen und die Sekretzellhaare des Kelches sind dicht mit roten Kugeln erfüllt, welche bei Wasserzutritt zu einer rotbraunen Masse zusammenfließen. Diese wird mit Jodjodkalium schwarzbraun, bei nachfolgendem Kalizusatz aber wieder rot. In Alkohol wird ein Teil des Farbstoffes zu einer gelben Flüssigkeit gelöst. Schwefelsäure färbt violett, wahrscheinlich liegt ein Xanthocarotin vor (H. Solereder. Gatt. Rehmannia, Ber. bot. Ges., 1909, XXVII, S. 390).

Viele der in Algen und Pilzen auftretenden gelbroten Farbstoffe, die früher als Lipochrome bezeichnet wurden, sind als Carotine erkannt. Auch das Haematochrom ist ein Carotin. Eine Zusammenstellung dieser Fälle findet sich bei Czapek, Biochemie I, S. 177.

Den Chromoplasten nahe steht der **Augenfleck** (Stigma), der bei beweglichen Algen und Schwärmsporen gewöhnlich am vorderen Ende in der Einzahl auftritt und aus einem plasmatischen Stroma besteht, in dem ein ölartiger bräunlicher bis roter Körper eingelagert ist. Der Farbstoff zählt zu den Carotinen (Haematochrom, G. Klebs, Flagellatenstud. II, Ztschr. wiss. Zool., 1892, LV, 401), wenigstens wird der rote Augenfleck grüner Algen mit Schwefelsäure blau. Mit dem Augenfleck nicht zu verwechseln sind die bisweilen, aber nicht immer in den Kolonien (Syncrypta Volvox) auftretenden karminroten Pigmenttröpfchen, die in keiner Beziehung zum Chromatophor stehen und sich in der Nähe der Zelloberfläche und der Geißelbasis im farblosen Zellende befinden (A. Scherffel, Augenpunkt. v. Synura und Syncrypta, Ber. bot. Ges., 1904, XXII, 443).

Anthophaein.

Anthophaein, ein brauner im Zellsaft gelöster Farbstoff (Umwandlungsprodukt des Chlorophylls?)[3]), bedingt die schwarzen Flecken an den Flügeln der Blume

[1]) A. F. W. Schimper, Unters. üb. d. Chlorophyllkörn. u. die ihnen homol. Gebilde, Jahrb. f. wiss. Bot., 1885, XVI, 108. — H. Molisch, Vorübergeh. Rotfärb. d. Chlorophyllk. in Laubblätt., Ber. d. bot. Ges., 1902, XX, 442. — L. Courchet, Rech. s. l. chromoleucites, Ann. scienc. nat., 1888, VII, 350.

[2]) H. Schmied, Carotin in den Wurzeln von Dracaena und Liliaceen, Öster. bot. Ztg., 1903, LIII, 313.

[3]) M. Moebius, Das Anthophaein, der braune Blütenfarbstoff, Ber. deutsch. bot. Ges., 1900, XVIII, S. 341 u.: Beitr. z. Blütenbiol. u. z. Kenntn. d. Blüten-

von Vicia faba, die Braunfärbung der Blumenblätter von Delphinium-Arten (Lit. S. 344, 5). Im allgemeinen tritt der Farbstoff nur in vereinzelten Fällen auf, besonders in Orchideen (Coelogyne-Arten, Maxillaria (Fruchtknoten), Pholidota artic., Platyclinis glum.).

Anthophaein ist nach Moebius in Alkohol, Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff unlöslich, löst sich aber leicht in Wasser und wird aus der wässer. Lösung durch verd. Säuren und Alkalien gefällt. Der Farbstoff nimmt durch Essigsäure eine intensive Färbung an, durch Alkalien erfolgt kein Farbenumschlag (Unterschied von Anthocyan). Nach Schlockow (Lit. 364 ob.) bleibt Anthophaein unverändert, wenn die Blüten einige Tage in Alkohol gelegen haben, was aus der Unlöslichkeit des Farbstoffes in Alkohol hervorgeht.

Phaeophyll.

Braunes Chlorophyll, Phaeophyll, führen die Chromatophoren der Orchidee Neottia nidus avis. Lebende Pflanzen werden beim Absterben grün. Auch beim Behandeln lebenden Materials oder von Präparaten solchen Materials mit Alkohol, Äther[1], heißem Wasser, Wasserdämpfen[2], Benzol, Schwefelkohlenstoff[3], wässer. Lösungen von Aldehyden und aldehydartigen Körpern, Kaliumnitrit und Ferrosulfat geht die braune Farbe in Grün über. Durch die angeführten Reagentien wird Chlorophyll, das in der lebenden Pflanze nicht auftritt, aus dem Phaeophyll gebildet, wie Schimper (Lit. S. 473, 1) meint, der auch in der Fruchtwand in den Chromatophoren den braunen Farbstoff in nadelförmigen Kristallen antraf.

Die Proteinfarbstoffe der Algen.

Phykoerythrin.

Die Chromatophoren der Florideen führen neben Chlorophyll einen roten, mit Wasser ausziehbaren Farbstoff, das Phykoerythrin Kützings (Phycologica generalis, Leipzig 1843), das auch vielfach in Cyanophyceen vorkommt. Der Farbstoff wird dargestellt, indem man die, bei Lichtabschluß und bei 35° gewonnenen wässerigen Auszüge (Nitrophyllum punct. u. a.) langsam verdunsten

farbstoffe, Ber. deutsch. bot. Ges., 1912, XXX, S. 365. — Clamor Marquardt (Lit. S. 342) u. F. Hildebrand (Lit. S. 344, 5).

[1]) J. Wiesner, Unters. üb. d. Farbstoffe einig. für chlorophyllfrei gehalt. Phanerogam., Jahrb. f. wiss. Bot., 1872, VIII, S. 575.

[2]) H. Molisch, Üb. d. braun. Farbstoff d. Phaeophyceen u. Diatomeen, Bot. Ztg., 1905, LXIII, S. 131.

[3]) O. Lindt, Umbildung d. braun. Farbstoffkörp. in Neottia nidus avis zu Chlorophyll, Bot. Ztg., 1885, XLIII, S. 825.

läßt. Es scheiden sich rote wasserlösliche Kristalle ab. Der Farbstoff liegt in Form einer Eiweißverbindung vor (A. Hansen) und wird daher aus wässeriger Lösung durch Neutralsalze ausgesalzt. Beim Einlegen lebender Algen in Öl oder Äther wird Chlorophyll ausgezogen, während Phykoerythrin in den Chromatophoren verbleibt[1].

Cramer fand beim Einlegen lebender Algen in konz. Kochsalzlös., später auch in Alkoholmaterial, Cohn auch in verschlossenen Deckglaspräparaten (Seewasserglyzerin) rote Kristalle, die nach längerer Zeit farblos wurden, dann Eiweißreaktion gaben und Rhodospermin genannt wurden[2]). Rhodospermin ist der proteinartige Anteil des Phykoerythrins. Um Phykoerythrinkristalloide, die sich übrigens auch bei, im Meerwasser abgestorbenen Algen vorfinden, innerhalb der Zelle zur Ausscheidung zu bringen, bringt man lebende Algen (Nitrophyllum, Ceramium, Porphyra, Gelidium u. a.) auf mehrere Tage in eine 10% Kochsalzlösung, der einige Tropfen Schwefelkohlenstoff zugesetzt sind. Der Schwefelkohlenstoff tötet die Algen rasch, fördert den Austritt des Farbstoffes aus den Chromatophoren in den Zellsaft und hindert das Faulen der toten Algen. Man kann die Kristallbildung unter dem Mikroskop verfolgen beim Einlegen von kleinen Thallusstücken auf den Objektträger in 10% Chlornatrium, Magnesiumsulfat oder Ammoniumsulfat. Nach einigen Stunden beginnt die Kristallisation: es entstehen entweder zahlreiche kleine oder einige größere Kristalle. Polysiphonia-Arten und Antithamnion geben keine Kristalloide. Bruns (Lit. S. 4, 2) gelang die Kristallisation mit konz. Kochsalzlösung in Meerwasser und mit 1% Formaldehydlösung bei Wrangelia, Nemastoma cervic. und Vidalia. Kylin[3]) benutzt eine 5% Lösung von Kochsalz oder Ammoniumsulfat mit Toluolzusatz.

Die Phykoerythrinkristalloide haben die Form hexagonaler Prismen; zuweilen sind sie nadelförmig und schollenartig. Sie werden bis 50 μ lang (die makrochemisch dargestellten sogar bis 480 μ lang und bis 12 μ breit), sind unlöslich in Alkohol, Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Olivenöl und Terpentinöl. Die frisch gefällten Kristalloide sind

[1]) J. Klein, Krist. einig. Florideen, Flora, 1871, LIV, 161 u.: Krist. d. Meeresalg., Jahrb. wiss. Bot., 1882, XIII, 23. — F. Schütt, Phykoerythr., Ber. bot. Ges., 1888, VII, 36 und 305. — A. Hansen, Stoffb. b. Meeresalg., Mitt. zool. Stat. Neapel, 1893, XI, 255. — H. Molisch, D. Phykoerythr., s. Kristallisierbark. u. chem. Nat., Bot. Ztg., 1894, LII, 177.

[2]) C. Cramer, Rhodospermin, ein krist., quellb. Körp. im Zellinh. versch. Florid., Natf. Ges. Zürich, 1861, VII, 350. — F. Cohn, Beitr. z. Phys. d. Phykochrom. u. Florid., M. Schultze's Arch., 1867, III, S. 1.

[3]) H. Kylin, Über die roten und blauen Farbstoffe der Algen, Ztschr. f. phys. Chem., 1912, LXXVI, S. 396.

in Wasser löslich. mit dem Alter nimmt ihre Löslichkeit in Wasser ab. In Glyzerin lösen sie sich langsam, jedoch nicht mehr nach vorausgegangener Behandlung mit Alkohol. Sie verquellen unter Entfärbung bis zum Verschwinden in verd. Kalilauge, Natronlauge, Ammoniak, Barytwasser. „Von starker Natronlauge werden sie erst violett, dann blau, blaugrün, grün und zuweilen (Porphyra) braungelb gefärbt" (Gaidukov)[1]), von konz. Kalilauge blau, blaugrün. malachitgrün. In konz. Säuren zerfließen sie, in verd. Säuren (1 + 6 Wasser) werden sie violett bis ziegelrot. Entfärbte Kristalloide (das Entfärben gelingt leicht, indem man die Präparate mehrere Tage dem direkten Sonnenlichte aussetzt, Bromdampf greift die Kristalloide zu sehr an) geben Eiweißreaktionen. Durch Erhitzen auf 100° und längere Alkoholbehandlung werden sie unlöslich.

Phykocyan.

Die Chromatophoren der Cyanophyceen führen einen blaugrünen Farbstoff (Cohns Phykochrom), der aus Chlorophyll und einem blauen wasserlöslichen Farbstoff, dem Phykocyan Kützings besteht. Man nimmt mehrere Phykocyane an, die sich durch die Farbe ihrer wässerigen Lösungen, ihr spektroskopisches Verhalten und ihre Kristallisationsfähigkeit unterscheiden (H. C. Sorby nahm schon 3 Phykocyane an [blue, purple, pink], s. auch H. Molisch [Sitzb. Wien. Ak., 1906, CXV1, 795] u. H. Kylin, Lit. S. 475,3). Seit Hansen (Lit. S. 475,1) werden die Phykocyane als (meist kristallisierbare) Farbstoffe eiweißartiger Natur betrachtet (auch H. Molisch, Bot. Ztg., 1895, LIII, 131). Makrochemisch erhält man sie aus dem bei Lichtabschluß erhaltenen wässerigen Auszuge (Oscillaria leptotricha), den man mit Ammonsulfat aussalzt und verdunsten läßt (5—42 μ lange Kristalle des monoklinen Systems, Kombination von Prisma u. Klinodoma, Becke).

Die frisch gefällten Phykocyankristalle sind von weicher Konsistenz, indigoblau, löslich in Wasser. Glyzerin, verd. Alkalien, unlöslich in verd. Säuren. Alkohol. Äther, Benzol u. a. Salpetersäure färbt karminrot, dann gelb, Schwefelsäure löst, Salzsäure und Eisessig bildet schaumige Tropfen. Durch Alkoholbehandlung werden sie unlöslich in Wasser. Entfärbte Kristalle (Bromwasser, direktes Sonnenlicht, 2 Min.) geben Eiweißreaktionen (Jod, Eosin). Die Lokalisation des Farbstoffes kann unter Deckglas mit konz. Essigsäure festgestellt werden. Die dem Wasser entnommenen Algen werden mit Filtrierpapier schnell abgetupft und in Essigsäure gebracht. Das Chlorophyllgrün bildet am Deckglasrande Chlorophyllankristalle, zwischen den Algenfäden erscheinen orangerote Carotinkristalle. das Phykocyan bleibt in der Zelle und ist mikroskopisch gut zu sehen, besonders bei übereinandergelagerten Fäden.

[1]) N. Gaidukov, Zur Farbenanalyse der Algen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1904, XXII, S. 27.

Phaeophyceenfarbstoffe.

Die Chromatophoren der Phaeophyceen führen einen gelbbraunen Farbstoff (Cohns Phaeophyll), der aus Chlorophyll (Sachs, A. Hansen, Würzb. Arb., 1885, III, 293) und Phykophaein, dem eigentlichen Phaeophyceenbraun, besteht. Die braune Farbe geht in Grün über nach kurzem Behandeln mit heißem Wasser, Äther-, Chloroform- und Wasserdämpfen (J. Reinke, Jahrb. wiss. Bot., 1876, X, 410), Azetondämpfen (Molisch, Lit. S. 474, 2) und mit nicht zu verd. Lösungen von Benz- oder Propylaldehyd. Diese Reaktionen lassen sich mikroskopisch verfolgen. Anderseits bleibt der Farbstoff durch Abtöten der Algen in Glyzerin, Petroläther und dest. Wasser erhalten (Tswett). Die Natur des braunen Anteiles ist noch nicht völlig geklärt (näheres bei Th. W. Engelmann, Bot. Ztg., 1882, XL, 663, M. Tswett, Bot. Ztg., 1905, LXIII_2, 274, Fr. Czapek, Lotos, 1911, LIX, 250, Kylin u. a.)

Diatomeenfarbstoffe.

Die braungelben Farbstoffe der Diatomeen (Diatomin) sind noch nicht genügend erforscht; sie stimmen vielleicht mit den Farbstoffen der Peridineen (Pyrrophyll, Schütt) überein, nach Molisch auch mit dem Phaeophyceenfarbstoff. Fügt man zu einer unter Deckglas liegenden Diatomeenmasse absoluten Alkohol zu, so scheiden sich beim Verdunsten des Alkohols gelbliche Tropfen und nahe dem Deckglasrande grüne Tropfen aus. Die gelben Tropfen werden nach dem Eintrocknen durch Salzsäuredampf blau gefärbt. Durch nicht zu verd. wässerige Lösungen von Propyl- oder Benzaldehyd werden lebende Algen nach einiger Zeit grün.

Eiweißkristalloide.

Eiweißkristalloide kommen vor: 1. als Einschlüsse des Zellkerns[1]), 2. als Einschlüsse der Chromatophoren (A. Meyer, Lit. S. 33, 1, Schimper, Lit. S. 473, 1) (und Pyrenoide) und 3. im Cytoplasma und im Zellsaft (in Vakuolen und Aleuronkörnern). Bei Polypodium ireoides u. a. kommen sie gleichzeitig im Zellkern und im Cytoplasma oder im Zellsaft vor[2]). Sie sind erythrophil. Die Kristalloide können wieder in den Stoffwechsel einbezogen werden. Eiweißkristalloide führende Pflanzen zeigen bei Kultur in kalkfreier Nährlösung eine vermehrte Bildung und Ansammlung von Kristalloiden: so führt Rivina humilis normal nur Zellkernkristalloide, bei kalkfreier Kultur aber auch im Zellsaft und bei Veronica chamaedrys, die normal ebenfalls nur im

[1]) Zuerst aufgefunden und beschrieben von Radlkofer, Über Kristalle proteinartiger Körper pflanzlichen und tierischen Ursprungs, Leipzig, 1859.

[2]) A. Zimmermann, Über die Proteinkristalloide, Beitr. z. Morph. u. Phys. d. Pflanzenzelle, 1890, Heft I, S. 54, Heft II, S. 112.

Zellkern Kristalloide hat, sind sie dann auch in den Chromatophoren[1]). Die physikalisch-kristallographischen Eigenschaften der Kristalloide wurden von Naegeli und Schimper studiert (s. Aleuron).

Eiweißkristalloide im Zellkern.

In den Zellkernen sind Eiweißkristalloide nicht selten. Radlkofer (Lit. S. 477, 1) beschreibt sie bei Lathraea. Vogl (Lit. S. 150, 1)[2]), der sie mit Cochenille färbt, bei Campanula trachelium (Fig. 110a). Sie kommen vor in den Zellkernen von Pinguicula, Galtonia, Urticularia[3]), Stylidium, Pirola[4]), Hyacynthus, Convolvulus; Campanula-Arten, Mimulus (Samenknospe), Candollea adnata (Palisaden), Alectorolophus major (Fruchtwand, Fig. 110b), Melampyrum arvense (Schwammparenchym, Fig. 110c), Lophospermum scandens (Epidermis), Polypodium ireoides u. a. (Lit. S. 477, 2), Ornithogalum caudatum (Fruchtknotenwand)[5]), Clandestina (Tracheidenkopf)[6]). Sie kommen schon in nächster Nähe der Vegetationspunkte und in jugendlichen Keimpflanzen vor.

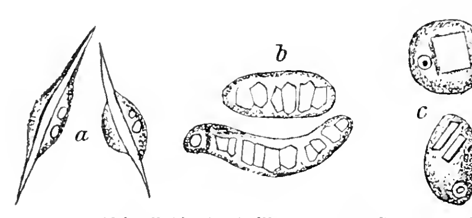


Fig. 110. Kristalloide in Zellkernen: a) Campanula trachelium (Wurzel), b) Alectorolophus adnata (Fruchtwand), c) Melampyrum arvense (Blatt). (b nach Zimmermann.)

Die Kristalloide treten in der Ein- und Mehrzahl in den Kernen auf, sind rundlich, tafel-, stäbchen- und nadelförmig. Letztere sind zuweilen verbogen. Sie sind sehr empfindliche Gebilde und schon Vogl 1867 und dann Leitgeb[7]) wiesen darauf hin, daß sie durch den Säuregehalt des Zellsaftes rasch zerstört werden und sich meist in sehr verd. Essigsäure auflösen. An stärkeren Stellen der Präparate (in unverletzten Zellen) sind sie bei lebendem Material in den meisten Fällen ohne weiteres

[1]) Stock, Z. Kenntn. d. Proteinkristalle, Tübinger Diss., Breslau 1892.

[2]) Vogl hebt die Löslichkeit in Wasser bei nachfolgendem Alkoholzusatz hervor und sagt: „Bei Zusatz von Äther und Alkohol entstehen später sehr kleine, spießige Kristalle." Der Befund sollte nachgeprüft werden.

[3]) J. Klein, Die Zellkernkristalloide von Pinguicula und Urticularia, Jahrb. f. wiss. Bot., 1882, XIII, S. 60.

[4]) Raunkjär, Bot. Centralbl., 1887, XXX, S. 236.

[5]) E. Straßburger, Bot. Prakt., 1897, Pens. IV.

[6]) E. Heinricher, Lit. S. 94, 1 u.: Vorkommen von Eiweißkristallen bei Lathraea, Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, XXXV, S. 28.

[7]) H. Leitgeb, Proteinkr. i. Zellk., Graz. Mitt., 1886, I, 115.

gut sichtbar und heben sich auch von den Nukleolen durch ihre Größe und Gestalt genügend scharf ab. Nur wenn sie sehr klein sind und rundliche Form besitzen, so daß sie mit Nukleolen verwechselt werden können, oder zu Dauerpräparaten wird man zur Fixierung und Färbung greifen. Als Fixierungsmittel hat sich konz. alkoholische Sublimatlösung bewährt (Kutikula einschneiden!) sowie Merkels Flüssigkeit. Gefärbt wird nach Zimmermann[1]) mit 0,2 % wässer. Lösung von Fuchsin. Diese Lösung, die bis in die neueste Zeit überwiegend benutzt[2]) wird und durch Zusatz von etwas Kampfer haltbar gemacht werden kann, färbt in 12—24 Stunden. Die Präparate werden sofort in fließendem Wasser ausgewaschen, die Färbung, die sich nur auf die Kristalloide beschränkt, hält sich in Kanadabalsam. Man kann auch Mikrotomschnitte mit konz. Säurefuchsinlösung erwärmen und zum Auswaschen warme konz. wässer. Kaliumdichromatlösung benutzen. Gute Färbungen geben ferner Fuchsin-Jodgrün, Fuchsin-Pikrinsäure, Haematoxylin u. a. Huie[3]) gebraucht zum Fixieren die Mannsche Lösung (Ztschr. f. wiss. Mikr., 1894, XI, S. 479: 12 g Sublimat, 0,75 Chlornatrium in 100 g Wasser, 1 g Pikrinsäure, 1 g Tannin) und färbte 24 Stunden mit einem Gemisch von 35 ccm 1 % wässer. Methylenblau und 45 ccm 1 % wässer. Eosin. Dann folgt Umschwenken in Wasser, Entwässern mit Alkohol und Übertragung bis zur Rotbraunfärbung in ein Gemisch von 30 ccm Alkohol und 4 Tropfen 1 % alkoholischer Natronlauge; ferner Entfernen der Natronlauge mit Alkohol, 1 Minute in Wasser, 2 Minuten in mit Essigsäure angesäuertem Wasser, Entwässern, Xylol, Kanadabalsam. Heinricher fixiert die sehr hinfälligen Kristalloide in Clandestina mit siedendem Alkohol und färbt mit Böhmers Haematoxylin (schwarzviolett), Gentianaviolett (blau) oder Fuchsin (rot). Doppelfärbungen führte Zimmermann mit Säurefuchsin und Delafieldschem Haematoxylin aus (Kristalloide rot, Kerngerüst blau). Die gleiche Färbung bewährte sich nach Sperlich[4]) bei Alectorolophus.

Eiweißkristalloide in Chromatophoren.

Die Eiweißkristalloide sind meist langgestreckte Prismen, fein ausgezogene Nadeln, würfel- und oktaederförmig. Ecken und Kanten sind oft undeutlich aus-

---

[1]) A. Zimmermann, Üb. d. tinktionelle Verhalten der Zellkernkristalloide, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1893, X, S. 211.

[2]) A. Mrazek, Über geformte eiweißartige Inhaltskörper bei den Leguminosen, Öster. bot. Ztschr., 1910, LX, S. 198.

[3]) L. Huie, On some protein crystalloids and their probable relation to the nutrition of the pollentube, La Cellule, 1895, XI, S. 1.

[4]) A. Sperlich, Die Zellkernkristalloide von Alectorolophus, Bot. Centralbl., Beih., 1906, XXI, S. 1.

gebildet. Größere Kristalloide treten, das Stroma stark zurückdrängend, in der Einzahl, kleinere zu mehreren auf.

In lebendem Material werden die meisten Kristalloide in Wasserpräparaten ziemlich schnell zerstört. Zuweilen sind sie in Wasser unlöslich (Canna). Sie heben sich oft nur wenig vom gefärbten Chromatophor ab. Man beobachtet in 4% Rohrzuckerlösung oder fixiert und färbt mit alkoholischer Sublimatlösung und Säurefuchsin-Kaliumdichromat (Zimmermann, s. auch S. 479); das Stroma bleibt farblos, die Kristalloide treten rot gefärbt hervor. In Alkoholmaterial sind sie gehärtet und leichter auffindbar (der Farbstoff ist entfernt), in Drogen findet man sie selten. In den Chromatophoren der Blätter und Stengel sind sie oft anzutreffen (Pellionia, Convolvulus tric., Hedera spec. Vanilla, Canna, Drimys u. a., Fig. 111), hier und da in Knollen (Phajus grandif.), selten in Wurzeln. In der Wurzel von Psychotria emetica[1]) (Kork, äußeres Rindenparenchym) sind lang ausgezogene nadelförmige Kristalloide (Fig. 111c). Vielleicht zählen die spindelförmigen Gebilde von Eiweißcharakter im Rindenparenchym von Nepenthes melamph.[2]) und der Balsaminen ebenfalls hierher.

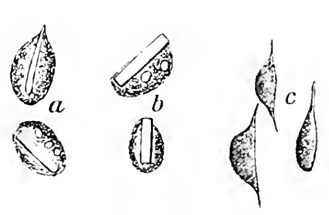


Fig. 111. Kristalloide in Chromatophoren: *a*) Exogonium purga (Kelch), *b*) Hedera helix (Blattstiel), *c*) Psychotria emetica (Wurzel). (*c* nach Hartwich.)

Leukosomen nennt Zimmermann (Mikrot. S. 200) sehr kleine kuglige Einschlüsse der Leukoplasten (in der Einzahl oder zu mehreren auftretend), die sehr empfindlich sind, von Wasser gelöst, von Kaliumdichromat zerstört werden, mit 0.2% Säurefuchsin bei mit konz. alkoholischem Sublimat fixiertem Material (Tradescantia, Tangentialschnitte der Blätter) färbbar sind und ihren Reaktionen nach (Jodwasser, Xanthoproteinreaktion, Millons Reagens) den Eiweißstoffen nahestehen.

Eiweißkristalloide im Cytoplasma.

Die im Cytoplasma und im Zellsaft vorkommenden Eiweißkristalloide sind von verschiedener Form: würfelförmig (Kartoffel)[3]), oktaederartig (Polypodium ireoides, untere Blattepidermis), wetzsteinförmig (Vanda furva, Passiflora-Arten), spindel- bis gedreht nadelförmig

[1]) C. Hartwich, Boliv. Drog., Schw. Wchschr. Ch. Ph., 1909, XLVII, Nr. 10.

[2]) E. Heinricher, Biol. v. Nepenth., Ann. Buitenz., 1906, V, 227.

[3]) Von F. Cohn (37. Jahrb. schles. Ges. vaterl. Kult., Breslau, 1860) aufgefunden, der die Quellungsfähigkeit der Kristalloide betonte und darauf hinwies, daß ihre Löslichkeit von der Lokalisation abhängt. Die nahe dem Kork gelagerten Kristalloide sind am schwersten löslich.

(Gratiola off., Fruchtknotenwand, Scilla, Griffel [hier werden sie vom wachsenden Pollenschlauch aufgebraucht. Huie, Lit. S. 479, 3]), ringförmig (Epiphyllum, Zweige)[1]. Kristalloide finden sich in Oncidium micr. (Blatt)[2], Leguminosen (Blüten)[3], Euphorbia splend. (Parenchym)[4], Abies (Rinde)[5], Capsicum (Frucht- und Scheidewand, Lit. S. 164, 1). In großer Menge kommen sie im Stamm wurzelfauler Kartoffelpflanzen vor[6].

Im Milchsaft von Musa finden sich in den Vakuolen Kristalloide, die in Wasser, Äther, Alkohol, Chloroform unlöslich sind, in 1% Mineralsäuren und in 1% Essigsäure etwas aufquellen, sich aber leicht in konz. Säuren und in verd. Kalilauge und Ammoniak lösen (Lit. S. 170, 3). Sie färben sich bei gewöhnlicher Temperatur mit wässer. Gentianaviolett-Methylenblau, mit Böhmers Haematoxylin, beim Erwärmen mit Methylgrün-Essigsäure und mit Säurefuchsin. Sie geben die Xanthoprotein-Reaktion und enthalten Gerbstoff (mit Eisensulfat, Blaufärbung). Wasserzutritt zu frischem Milchsaft macht die Vakuolen sichtbar und durch Quellung auch die kleinen Proteinkörner im Milchsafte zahlreicher anderer Pflanzen (Lit. S. 123, 1).

Ungemein kleine Plasma-Eiweißkristalle hat Heinricher in Lathraea aufgefunden (quadratische und rhombische Plättchen von 1 μ Seitenlänge. Diese lassen sich mit Sicherheit nur dann identifizieren, wenn gleichzeitig Zellkernkristalloide im Präparate zugegen sind und übereinstimmende Reaktionen erhalten werden. Doch kommen bei Lathraea auch große Kristalle im Plasma vor (Blumenkrone). In den Blättern von Phytolacca abyssinica fand Kruch[7] im subepidermalen Gewebe Kristalloide, die sich in 10—20% Chlornatrium- und Kaliumnitratlösung, Glyzerin, verd. Kalilauge, verd. Essig- und Salzsäure lösen, aber unlöslich in Wasser und in 5% Zuckerlösung sind und im übrigen Eiweißreaktionen geben.

An dieser Stelle seien die spindel- und nadelförmigen Körper angeführt, die in den Epidermiszellen von Drosera dichotoma und Dionaea meist in Einzahl auftreten, nach Reizung der Blätter sich abrunden und in mehrere Teile zerfallen, nach starker Reizung kleiner werden, von Gardiner als Reservestoffe angesprochen und Plastoiden (Rhab-

---

[1] H. Molisch, Merkw. Proteink. in Zweig. v. Epiphyll., Ber. bot. Ges., 1885, III, 195 u.: Chmielewsky, Bemerk. hierzu, Bot. Centralbl., 1887.
[2] K. Mikosch, Vork. geformt. Eiweißes, Ber. bot. Ges., 1890, VIII, 33.
[3] Baccarini, Bot. Centralbl., 1896, LXV, 391.
[4] Frey, Ann. of. Bot., 1891, V, 413.
[5] F. v. Höhnel, Sitzb. Wien. Ak., 1881, LXXXIV_1, 589.
[6] E. Heinricher, Ber. deutsch. bot. Ges, 1891, IX, 287.
[7] O. Kruch, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1896, XIII, S. 390.

doiden) genannt wurden[1]. Sie lassen sich durch Alkohol. 1 % Chromsäure und Pikrinsäure fixieren, nehmen durch Jodjodkalium sphäritische Gestalt an und verquellen in verd. Alkohol bis zum Verschwinden.

Eigenartige durchsichtige Eiweißkristalloide wurden von Noll[2]) in den Siphoneen Derbesia und Bryopsis aufgefunden. Es sind Sphärokristalle und fasrige, aus kleinen Nadeln bestehende Gebilde, die sich vorgebildet im Zellsaft finden, in der lebenden Zelle aber wenig deutlich hervortreten. Ihr schwaches Lichtbrechungsvermögen deutet auf einen hohen Wassergehalt hin. Sie werden aber sichtbar, wenn man das Deckglas gelinde drückt. Beim Zerreißen des Thallus werden sie herausgeschleudert, verkleben hierbei zum Teil untereinander und unterstützen derart den Wundverschluß[3]). Sie sind am reichlichsten bei gut ernährten Algen vorhanden (Reservestoffe). Sie färben sich mit Jodjodkalium, werden, nach vorausgegangener Beizung mit wässeriger Tanninlösung und Auswaschen, mit 1 % Osmiumsäure braun[4]) und speichern Cochenille (rotbraun), Methylenblau, Safranin, Neutralrot, Kongorot, Eosin, Nigrosin, Thionin. Die Färbung ist verschieden, die strahlig radialen Kugeln werden mit Eosin gelbrot, die Fasergebilde dunkelrot (Noll)[5]). Sie sind widerstandsfähig gegen Süßwasser, Glyzerin, Salzsäure, Kalilauge, zerfallen beim Kochen in Glyzerin bei 290 °, lösen sich in heißer Schwefelsäure, werden durch Alkohol trübe und undurchsichtig.

Pyrenoide.

Pyrenoide (Fr. Schmitz, Jahrb. wiss. Bot., 1884, XV, 1), Stärkeherde, stark lichtbrechende Einschlüsse der Chromatophoren vieler Algen, bei Anthoceros und im Protonema einiger Laubmoose, bestehen aus einem proteinhaltigen Kern, der von einer hyalinen Zone, der Stärkehülle (bei Euglena von Paramylon) umgeben ist. Sie treten in lebenden Zellen nicht immer gut hervor, besser in fixiertem Material (oft genügt Eintauchen in kochendes Wasser). Der Eiweißkern ist teils nicht kristallinisch, teils kristallinisch (Cladophora, Bryopsis, Schimper (Lit. S. 473, 1), Prasiola, Lagerheim (Ber. bot. Ges., 1892, X, 366), Haematococcus, Wollenweber (Festschr. bot. Ges., 1908, XXV, 238). Die Pyrenoide entstehen durch Teilung (Zimmermann [Lit. S. 105, 1], Klebahn [Jahrb. wiss. Bot., XXII, 415]), wahrscheinlich sind sie schon in den Leukoplasten angelegt (Zumstein, Lit. S. 467). Bei Volvox u. Gonium gibt Overton (Bot. Centralbl., 1889, XXXIX, 148) Neu-

---

[1]) W. Gardiner, On the Phenomena accompanying Stimulation of the Gland-Cells in the Tentacles of Drosera dichotoma. Proc. roy. Soc. London, V, XXXIX, S. 229. — Rhabdoiden nannte Wakker fadenförmige Kristalloide im Knollen von Tecophilea cyanoc., die mit Millon und Salpetersäure nicht reagieren (Ein neuer Inhaltsk. d. Pflanzenzelle, Jahrb. wiss. Bot., 1891, XXIII, 1).

[2]) F. Noll, Exper. Unters. üb. d. Wachstum d. Zellmembr., Habilitationsschr. u. Abh. Senckenb. Ges., 1887, XV, 101.

[3]) E. Küster, Derbesia u. Bryopsis, Ber. bot. Ges., 1899, XVII, 77.

[4]) A. Ernst, Zellinh. v. Derbesia, Flora, 1904, XCIII, 514.

[5]) F. Noll, Geformte Prot. v. Derbesia, Ber. bot. Ges., 1899, XVII, 302.

bildung an. Timberlake (Ann. of. Bot., 1909, XV, 619) weist auf Beziehungen zur Stärkebildung hin (Hydrodictyon) und nach v. Derschau (Ber. bot. Ges., 1909, XXVII, 99) wird die Kernsubstanz „zum Zwecke der Stärkebildung den Chromatophoren zugeführt“.

Von der Stärkehülle hebt sich die Pyrenoidmembran in doppelter Kontur scharf ab. Die Membran ist widerstandsfähig gegen Millon, während die Chromatophoren mehr oder weniger zerstört werden. Millons Reagens benutzt man somit zur Sichtbarmachung der Pyrenoide[1] (auch die sog. Pyrenoidbänder [Spirogyra, Mougeotia] sind gegen Millon widerstandsfähig). Meist wird jedoch fixiert und gefärbt: Fixierung mit konz. Sublimatalkohol, Auswaschen. 24stündige Färbung in 2 % Säurefuchsin, Auswaschen in Wasser (10—20 Min.). Entwässern, Kanadabalsam (Pyrenoide rot). Chmielewski (Strasburgers Prakt.) fixiert mit 10 % rotem Blutlaugensalz + Essigsäure und färbt mit Hofmanns Violett.

Zimmermann (Mikrot., S. 202) benutzt Pikrinsäure-Säurefuchsin. Auf ein Uhrgläschen mit konz. Lösung von Pikrinsäure in 50 % Alkohol kommen 5 Tropfen konz. Säurefuchsinlösung (Einwirkung einige Stunden, Auswaschen mit Alkohol 10—20 Min., Einschließen in Kanadabalsam). Mit Nigrosin-Pikrinsäure bleibt die Haut farblos, die Kristalloide werden blau. Boubier färbt mit 2—5 % Kongorot und 0.5 % Chrysoidin und bringt die Präparate auf einen Augenblick in Millons Reagens: Chromatophoren, Kristalloide nebst Pyrenoidmembran werden blau. — Außerdem behandelt er Algenmaterial nacheinander mit Jodwasser, Wasser, Sublimatalkohol, Alkohol und Chloralhydrat und färbt mit einer Lösung von Säurefuchsin in Chloralhydrat; hierbei hebt sich die Membran ab und färbt sich nur schwach, während Zellkerne und Kristalloide rot werden.

Diatomeenpyrenoide, die nach Mereschkowsky[2] farblos sein dürften, lassen sich mit Rubin-Orange-Methylgrüngemisch färben (Mitrophanow)[3], Euglenenpyrenoide mit Rubin S und Coccinin (Dangeard)[4]. Bei letzteren erhält man gute Bilder bei Behandlung der Präparate auf dem Objektträger mit Säurefuchsin, verd. Pikrinsäure und verd. Glyzerin. Verd. wässer. Gentianaviolett benutzte Schmitz.

---

[1] A. M. Boubier, Contr. à l'ét. du pyrenoide, Bull. de l'Herb. Boissier, 1899, VII, S. 451.

[2] C. Mereschkowsky, Über farblose Pyrenoide und gefärbte Eläoplasten der Diatomeen, Flora, 1903, XCII, S. 77.

[3] P. Mitrophanow, Beob. üb. Diatom., Flora, 1898, LXXXV, 293.

[4] P. A. Dangeard, Rech. s. Eugl., Le Bot., 1902, VIII, 97.

Nach Hieronymus[1]) soll bei Dicranochaete reniformis das Kristalloid von einer proteinhaltigen Hülle umschlossen und die Stärkesubstanz an anderen Stellen der Chromatophoren eingebettet sein. Das Kristalloid soll sich nicht nur in verd. u. konz. Kalilauge, Essigsäure, Salzsäure und Kochsalzlösung, sondern auch in kochendem Wasser lösen. Durch Alkohol wird die Löslichkeit verringert, zur Färbung Safranin empfohlen. Die Proteinhülle soll sich lösen in konz. u. verd. Kalilauge und Salzsäure und sich mit Hämatoxylin und Kongorot färben. Bei Kombination von Safranin und Hämatoxylin wird die Hüllmasse violett, das Kristalloid rot. Während das Kristalloid durch Pepsinsalzsäure (1 Vol. Pepsinglyzerin und 3 Vol. 0.2 % Salzsäure) in einigen Tagen angegriffen wird, bleibt die Hülle vollständig unverändert.

Zur Färbung der kinoplasmatischen Verbindungsfäden von Pyrenoid und Zellkern leistet bei Chlorophyceen eine sehr verd. Lösung von Jodwasser-Eosin gute Dienste (v. Derschau, Lit. S. 488 ob., Stärke blau, Zellkerne, Pyrenoide und Verbindungsfäden rosenrot). Auch Eisenhämatoxylin läßt sich benutzen.

Characeenkörper.

Characeenkörper, Stachelkugeln, Wimperkörper, sind kleine Gebilde, die vornehmlich an fixiertem Material (Nitella) neben den Zellkernen scharf hervortreten; sie sollen (Overton)[2]) aus kristallinischen Eiweißsubstanzen bestehen und oft auch Gerbstoff führen (Jodjodkalium braun, 10 % Rohrzucker + Schwefelsäure rot, Molybdänschwefelsäure bläulich). Sie färben sich nach Fixieren mit Sublimatalkohol mit Boraxcarmin und Fuchsin. Die kristallinische Struktur tritt am besten an mit Boraxcarmin gefärbten und in Tolubalsam eingebetteten Objekten hervor. Für ihren Gerbstoffgehalt sprechen die Reaktionen mit Osmiumsäure (hellbraun), Eisenchlorid (schwärzlich), 10 % Kaliumdichromat (braunrot) und Lebendfärbung mit Methylenblau. In Eisessig, Salzsäure, Salpetersäure, konz. Schwefelsäure bleiben sie fast unverändert und nehmen beim Kochen mit Natronlauge unter Lösung ihrer Stachelhülle eine schwammige Struktur an. — Die sog. nackten Stachelkugeln sind wasserhelle Blasen. Sie kommen bei einigen Characeen (Ch. fragilis, hispida) ausschließlich vor, während bei anderen Übergänge zwischen stachligen und nackten Formen auftreten. In ihren Reaktionen stimmen sie mit den Stachelkugeln überein.

---

[1]) G. Hieronymus, Über Dicranochaete reniformis, eine neue Protococcacee des Süßwassers, Cohns Beitr. z. Biol. d. Pflanz., 1890, V, S. 351.

[2]) E. Overton, Beiträge zur Histologie und Physiologie der Characeen, Bot. Centralbl., 1890, XLIV, S. 1.

Aleuronkörner.

Die Aleuronkörner wurden von Th. Hartig (Bot. Ztg., 1855, XIII, 881) entdeckt. v. Holle, der die Kristalloide 1858 mit Ammoniak auszog und die zurückbleibenden Globoide in verd. Essigsäure löste, sowie Maschke (Bot. Ztg., 1859, XVII, 409), der aus Bertholletia eine kristallinische Substanz gewann, arbeiteten überwiegend makrochemisch. Trécul (Ann. scienc. nat., 1858, X, 20) und Sachs (Bot. Ztg, 1862, X, 242) schrieben noch den Aleuronkörnern einen Fettgehalt zu. Unsere Kenntnis wurde am meisten gefördert durch die klassische Arbeit Pfeffers (Lit. S. 121, 3). Tschirch (Lit. S. 33, 3 u. S. 249, 2) zog die Körner zur Diagnose heran und klärte die morphologischen Verhältnisse auf. Mit der chemischen Erforschung der in den Körnern enthaltenen Eiweißstoffe beschäftigen sich Vines, Osborne u. a.

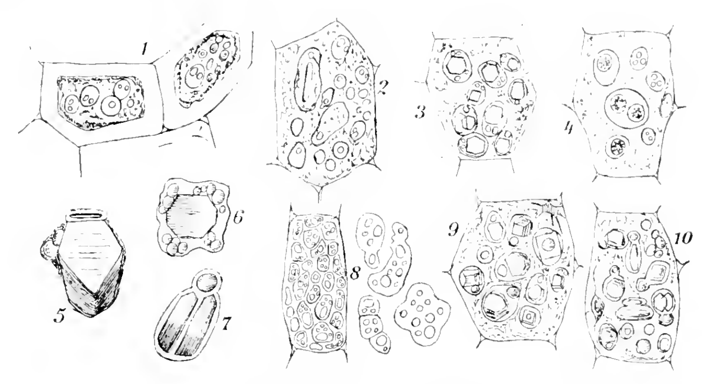


Fig. 112. Aleuronkörner von: Strychnos nux vomica *1*, Prunus amygdalus var. amar. *2*, Ricinus com. *3*, Ferula narthex *4*, Myristica surinamensis *5*, Bertholletia excelsa *6*, Linum usitatissimum *7*, Helianthus annuus *8*, Hyoscyamus niger *9*, Daphne mezereum *10*. Präparate in Sublimat-Alkohol, 8 in Osmiumsäure (Tunmann).

An einem Aleuronkorn unterscheidet man 1. die Gesamthaut, 2. die Grundmasse und 3. die Einschlüsse. Die Einschlüsse sind entweder a) Kristalloide, b) Globoide, c) Kristalle. Diese Einschlüsse vertreten sich meist gegenseitig und können sogar ganz fehlen (Papilionaceen, Lupinus, Pisum, Phaseolus). Anderseits kann die Grundmasse fast rudimentär werden (Myristica). Die Körner ein- und derselben Pflanze können verschiedene Einschlüsse besitzen, so daß einige Körner nur Kristalloide führen, andere nur Globoide (Theobroma) oder einige Körner nur Globoide, andere nur Kristalle (Pimpinella). Sehr häufig sind in einem Korne Globoide und Kristalloide (Papaver, Datura, Linum, Cannabis, Rizinus u. a.). Alle Einschlüsse können in der Ein- oder Mehrzahl zugegen sein. Die Größe der Körner schwankt von 1 bis 55—60 μ und wechselt je nach den Geweben und Gewebepartien. Die Körner der Randschichten des Endosperms sind oft kleiner als im inneren Endosperm (Hyoscyamus, Strychnos), im Embryo kleiner als im Endosperm (Datura). Die Mannigfaltigkeit im Aufbau der Aleuronkörner ist eine recht große (Fig. 112).

Die Aleuronkörner kommen ausschließlich im Samen vor (Endosperm, Perisperm, Embryo, für Pulveruntersuchungen diagnostisch wichtig!) und zwar vorzugsweise in ölreichen Samen, während sie im allgemeinen in stärkehaltigen Samen stark zurücktreten und auf gewisse Schichten beschränkt sind. Sie sind rundlich, eiförmig, polyedrisch, langgestreckt, gebogen, gelappt oder kristalloidartig. Das Cytoplasma bildet eine feine Ölemulsion (Ölplasma, Tschirch). Zuweilen scheint Öl zu fehlen, Schellenberg[1] konnte im Samen der Plantagoarten kein Öl ermitteln bei gleichzeitiger Anwesenheit von Eiweißkristallen und Globoiden. Beim Zentrifugieren angequollener oder angekeimter Samen sammeln sich die Aleuronkörner am zentrifugalen Ende der Zellen an, das Öl findet sich in den zentripetalen Zellenden (Andrews, Lit. S. 18, 1). Die Körner sind meist farblos bis hellgelb, selten grün (Zea mays, Acer, Evonymus, Pistacia), blau und braunrot.

Bildung und Auflösung der Körner verfolgte zuerst eingehender Gris[2]. Sie entstehen im letzten Stadium der Reife des Samens aus eiweißreichen Vakuolen, wie (im Gegensatz zu Lüdtke) Wakker (Lit. S. 116, 1), Belzung und Werminski[3] zeigten. Zuerst scheiden sich die Kristalle aus, dann die Globoide und Kristalloide und zuletzt die Grundsubstanz. Beim Keimen erfolgt die Lösung (proteolytische Enzyme) in umgekehrter Reihenfolge. Die Grundsubstanz löst sich bereits beim Einquellen der Samen, dann lösen sich die Kristalloide, später die Globoide. Die Kristalle werden sehr selten gelöst (bei Kalkmangel S. 137, 1). Aleuron bildet das Reserveeiweiß der Samen.

Zum Studium wählt man dünnere Präparate. Ein Einlegen in Wasser ist am besten zu vermeiden, da durch das Wasser das Ölplasma zersetzt wird und die frei werdenden Öltröpfchen und Ölmassen einen Einblick in das Präparat erschweren. Überdies wird im Wasser die Grundmasse der Körner gelöst, so daß die Körner zerfallen. Für den Anfänger ist auch die Gefahr nicht ausgeschlossen, kleinere, Schleimbläschen enthaltende Öltröpfchen mit Aleuronkörnern zu verwechseln. Zur Feststellung der Gestalt und Größe der Aleuronkörner, der Lage der einzelnen Körner in der Zelle und zueinander und ihrer Anzahl trägt man seit Hartig die Schnitte (die Samen dürfen zuvor nicht längere Zeit gewässert haben) direkt in Öl oder in Glyzerin ein. Ferner kommen als Einbettungsmittel Terpentin[4]) und Anilin[5]) in Betracht, sowie absoluter Alkohol. Letzterer bietet den Übelstand,

[1]) H. C. Schellenberg, Die Reservezellulose der Plantagineen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1904, XXII, S. 9.

[2]) Gris, Recherch. sur la germinat., Ann. d. scienc. nat., 1864, 5. sér. II, S. 98.

[3]) Fr. Lüdtke, Beitr. z. Kenntn. d. Aleuronkörner. Jahrb. wiss. Bot., 1889, XXI, 62. — E. Belzung, Développement des grains d'aleurone et structure protoplasmique en général chez quelques Papilionacées, Journ. de Bot., 1891, V, 85. — F. Werminski, Üb. d. Nat. d. Aleuronkörner, Ber. deutsch. bot. Ges., 1888, VI, 199.

[4]) A. L. Winton, Anat. d. Hanfs., Ztschr. Nahr.- u. Genußm., 1904, VII, 385.

[5]) O. Tunmann, Anw. v. Jodzuckerlös., Apoth. Ztg., 1912, XXVII, 261.

daß er schnell verdunstet und bald erneuert werden muß. Die Körner sind gut sichtbar, die Globoide erscheinen in den öligen Flüssigkeiten als kleine kuglige, hohl aussehende Gebilde, die Kristalloide sind nicht oder doch nur schwer sichtbar. Recht brauchbar ist eine konz. Rohrzuckerlösung. Die Präparate werden aufgehellt, selbst in stärkeren Schnitten sind die Körner sehr gut zu erkennen, ein störender Einfluß des Öles tritt nicht ein, das Deckglas haftet fest an, so daß die Präparate für einige Zeit als Dauerpräparate (S. 63) aufbewahrt werden können. Die Globoide erscheinen als Hohlkugeln. die aus den angeschnittenen Zellen herausgefallenen Körner lassen nach einiger Zeit auch die Kristalloide scharf hervortreten. Hinsichtlich der Erhaltungsdauer in Zuckerlösung lassen sich die Körner in 2 Gruppen gliedern. Bei der einen (Amygdalus, Linum) sind sie in unangeschnittenen Zellen ungefähr 2 Monate lang gut erhalten, nach längerer Zeit erfolgt allmähliche Zersetzung. Bei der anderen Gruppe (Rizinus) bleiben sie noch nach 6 Monaten völlig intakt.

Um die Körner noch schärfer hervortreten zu lassen, vereint man geeignete Einbettungsmittel mit Jod. Eingebürgert hat sich Jodglyzerin, Jodparaffin und Jodzuckerlösung (Jod 0.1—0.2 g, Jodkalium 0.3—0.5 g, konz. Zuckerlösung 10 g). Das Präparieren in letzterer ist selbst dem üblichen Beobachten nicht entfetteter Schnitte in Jod-Alkohol vorzuziehen. Bei dem Präparieren in Jod-Alkohol legt man die Präparate in Alkohol und fügt vorsichtig Jodjodkaliumlösung zu. Bei Zusatz von Jodjodkalium bläht sich die Gesamthaut auf, erscheint sackartig aufgedunsen, die sich gelb färbende Grundmasse löst, resp. zersetzt sich unter Quellung (infolge des Wassergehaltes der Reagens), die Kristalloide färben sich langsam gelb und treten gut hervor, während die Globoide ungefärbt bleiben. Am besten ist dieses Verfahren beim Rizinussamen angebracht. Je schwerer sich aber das im Plasma enthaltene Öl des betreffenden Samens in Alkohol löst, um so unklarer wird das Präparat, um so schwieriger die Beobachtung.

Sehen wir in den Öl- und Sirupppräparaten die Gestalt der Körner und der Globoide, so benutzen wir zur besseren Sichtbarmachung der Kristalloide 1 % Osmiumsäure. Die Ölmassen werden meist langsam braun, oft nach längerer Zeit schwarz, die Aleuronkörner bleiben, da sie kein Öl führen, zunächst farblos. Sehr scharf treten hierbei die Kristalloide hervor. Zerdrückt man ein zartes Präparat durch leichten Druck auf das Deckglas, so gelangen zahlreiche Aleuronkörner in den Untersuchungstropfen und man sieht unschwer, daß mehr oder weniger eine Trennung in der Weise eintritt, daß sich die leichteren Fetttropfen und Ölmassen in den oberen Schichten ansammeln, während die

spezifisch schweren Aleuronkörner in die tieferen Schichten des Untersuchungstropfen sinken. Bei oberer Einstellung der Mikrometerschraube bemerkt man vorzugsweise Öltropfen, bei tieferer Einstellung überwiegend die Aleuronkörner. Durch leichten Druck auf das Deckglas kommen die Aleuronkörner ins Rollen und können nun gut von allen Seiten beobachtet werden. Doch reagieren nicht alle Fette mit Osmiumsäure (S. 161), anderseits werden nach einiger Zeit auch die Aleuronkörner braun (Gerbstoffgehalt). Schneller wie Osmiumsäure wirkt Chromosmiumessigsäure. Auch andere Zellkern-, Fixierungs- und Färbungsmittel hat man als Beobachtungsmedien gebraucht; bewährt soll sich alkoholische Boraxcarminlösung haben (Rotfärbung).

Zu einer eingehenden mikrochemischen Untersuchung, vorzüglich zu vergleichenden Studien über die nähere Natur der Einzelbestandteile der Aleuronkörner sind entfettete Schnitte unbedingt erforderlich. Das Entfetten richtet sich nach der chemischen Natur des Öles. Zuweilen genügt bereits eine kurze Mazeration (20—30 Minuten) in möglichst absolutem Alkohol (Rizinus), meist eine 1—2tägige Mazeration der Präparate in einem Fläschchen mit absolutem Alkohol unter Umschütteln. Sollte das Öl sich schwer in Alkohol lösen, dann folgt der Alkoholmazeration eine mehrstündige Nachbehandlung mit Alkohol-Äther. Dadurch wird die Grundsubstanz etwas gehärtet und erweist sich schwerer löslich in Reagentien. Stärkere Mittel (Sublimatalkohol) sind nicht zu benutzen, da sie zu stark in den Chemismus der Körner eingreifen. Zur Konservierung benutzte Gram[1]) Formalin, wodurch die Kristalloide resistent gegen Kalilauge werden.

Die Gesamthaut, die Pfeffer zum Cytoplasma zählt, besitzt Eiweißcharakter. Sie schmiegt sich der Skulptur des Kornes dicht an, erscheint daher zuweilen grubig punktiert, worauf schon Hartig und Raffinesque[2]) hinwiesen; bei Wasserzutritt dehnt sie sich aus. In Alkohol-, Öl-, Glyzerin-, Anilinpräparaten ist sie nicht sichtbar. Um die Haut sichtbar zu machen, muß man an entfetteten Schnitten in geeigneter Weise die Grundmasse zuerst in Lösung bringen (Einlegen der Schnitte in Wasser). Fast stets ist die Gesamthaut unlöslich in Wasser (bei Amygdalus ist sie wasserlöslich, Kritzler). Gegen stark verd. Alkalien zeigt sie ein verschiedenes Verhalten.

Die Grundmasse ist farblos, bisweilen schwach gelblich, amorph, trübe, homogen oder schwach körnig und enthält neben Globulinen

[1]) B. Gram, Über die Proteinkörner im Samen der Ölgewächse, Landw. Versuchsst., 1902, LVII, S. 257.

[2]) M. G. Raffinesque, De l'enveloppe des grains d'Aleurone, Bull. Soc. Linnéenne de Paris, 1874.

nach Kritzler[1]) kleine Mengen von Albumosen. Hiermit stimmt überein, daß sie sich mit Vanillinsalzsäure rotviolett färbt. Diese Reaktion läßt sich bereits an nicht entfetteten Schnitten gut vornehmen, wenn man die Präparate direkt in die Lösung einträgt. Im allgemeinen ist die Grundsubstanz leicht löslich in Wasser. Bei Elaeis und Lupinus wird sie von Wasser nach Vines[2]) nicht gelöst. Verdünnte Alkalien lösen.

Die Globoide haben ihren Eiweißcharakter am meisten verloren und bestehen aus dem Kalzium- und Magnesiumsalz einer gepaarten Phosphorsäure mit organischem Paarling. Denn werden die Globoide im Schnitte mit konz. Kalilauge behandelt, so bleibt (Pfeffer) ein Rest zurück, der sich mit „Jod oder Anilin" färbt, „also die Anwesenheit eines stickstoffhaltigen, vermutlich proteinhaltigen Stoffes zu erkennen" gibt. Sie kommen von den Einschlüssen am häufigsten vor, sind zwar nicht in allen Körnern anzutreffen, wohl aber in den meisten Samen (nach Pfeffer in allen Samen). Die Globoide sind kugelig, eiförmig, biskuitförmig, seltener unregelmäßig gelappt oder traubenförmig und isotrop. In fetten Ölen, Anilin, Kanadabalsam, konz. Rohrzuckerlösung erscheinen sie als Hohlkugeln, da sie das Licht schwächer als jene Flüssigkeiten brechen. Die Betrachtung eines Wasserpräparates zeigt aber schon, daß die Globoide körperliche Bildungen sind. Über den Volutinnachweis S. 428. An Beziehungen des Volutins zu den Globoiden dachte Guillermond[3]).

Die Kristalloide sind eiweißartiger Natur, heben sich in Öl-, Alkohol-, Glyzerin-, Anilinpräparaten nicht von der Grundmasse ab, da Grundmasse und Kristalloide das Licht annähernd gleich stark brechen. Schon Radlkofer (S. 477, 1) wies auf die Ähnlichkeit der Kristalloide (Rizinus, Bertholletia, Sparganium) mit dem „Haematokristallin und den Dotterplättchen" hin. Ihre physikalischen Eigenschaften wurden sehr ausführlich von Naegeli[4]) studiert, der die Bezeichnung Kristalloid einführte, die Quellungsfähigkeit betonte und zeigte, daß sie mit einer Membran umgeben sind (übrigens sind die Globoide ebenfalls mit einem

[1]) H. Kritzler, Mikr. Unters. ü. d. Aleuronkörn., Diss. Bern, 1900, S. 74.

[2]) S. H. Vines, On the chemical composition of aleuron grains, Proc. Roy. Soc. London, 1879, XXVIII, S. 218.

[3]) Guillermond, Rech. cytolog. s. l. germination d. graines d. quelq. graminées et contribut. à l'étude des graines d'aleurone, Arch. d'anat. micr., 1908, X; Chifflot et Kimpflin (A propos des globoides des graines d'aleurone, Ass. fr. p. l'avanc. d. sc., Congr. d. Reims, 1907) verneinen derartige Beziehungen.

[4]) C. Naegeli, Über die aus Proteinsubstanzen bestehenden Kristalloide in der Paranuß, Sitzb. Münch. Akad., 1862, II, 120, Bot. Mitt., 1862, I, 217.

zarten Häutchen umgeben). Schimper[1] brachte uns aber den Beweis, daß ein solch tiefgreifender Unterschied zwischen Kristall und Kristalloid, wie ihn Naegeli annahm, nicht besteht. In kristallographischer Hinsicht sind bei den Kristalloiden nur „die Winkel etwas schwankend; die optischen Eigenschaften stimmen mit denjenigen echter Kristalle überein" (l. c. S. 65). Die Kristalle gehören dem regulären und hexagonalen System an. Regulär und tetraedrisch-hemiedrisch sind sie bei Rizinus, Euphorbia, Linum, Viola, Passiflora, Ruta, Menispermum canadense, hexagonal-rhomboedrisch-hemiedrisch bei Bertholletia, Myristica, Elaeis, Cocos, Taxus, Pinus, Sparganium, Solanaceen, Papaveraceen, Campanulaceen u. a. Die Kleinheit der Kristalloide und die Unbeständigkeit in der Ausbildung erschwert die genaue Kristallbestimmung sehr. Jedenfalls sind sie isotrop oder schwach doppelbrechend. Die beste Doppelbrechung zeigen die Kristalloide des hexagonalen Systems. Nach vorausgegangener Fixierung können sie gefärbt werden (siehe weiter unten). Nach mikrochemischen Untersuchungen bestehen sie aus mindestens zwei Globulinen von verschiedener Löslichkeit in 1—10% Normalsalzlösungen.

Die Löslichkeitsverhältnisse weisen Abweichungen auf. Nach Kritzler soll die Keimfähigkeit der Samen von der Löslichkeit der Kristalloide und letztere wiederum von dem Alter der Samen abhängig sein. Auf diese Weise soll sich die Keimfähigkeit der Samen ermitteln lassen. Nach Tunmann (Lit. S. 415, 3) vermag wohl hohes Alter der Samen die Löslichkeit der Kristalloide (und der Grundmasse) zu vermindern (Rizinus), doch lassen sich keine Schlüsse auf die Keimfähigkeit ziehen: die Keimung findet nur langsamer statt. Lakon[2]) fand bei Fraxinus Beziehungen zwischen Keimfähigkeit und dem in den Aleuronkörnern enthaltenen Mucin.

Die Kristalle gehören dem regulären oder dem hexagonalen System an und bestehen aus Kalziumoxalat. Oft kommen Drusen vor, die einen proteinhaltigen Kern führen, dann Tafeln, seltener Hendyoeder. Ihr Nachweis ist leicht zu führen (S. 115). Die Oxalatkristalle sind teils in der Grundmasse eingebettet, teils wie bei vielen Umbelliferen in den Globoiden. Nach Wittlin[3]) sind die Kristalle von keiner besonderen Haut umgeben. Löst man bei Myristica surinamensis (entfettete Schnitte) die Grundsubstanz mit Wasser, die Kristalloide mit verd. Kali, die

[1]) A. F. W. Schimper, Unters. üb. d. Proteinkristall. d. Pflanz., Diss. Straßburg, 1878 u.: Üb. d. Kristallis. d. eiweißart. Substanz., Ztschr. f. Krist. u. Min., 1881, V, 131.

[2]) G. Lakon, Anat. u. Keimungsphys. d. Eschensamen, Ztschr. Forst- u. Landw., 1911, IX, 285.

[3]) J. Wittlin, Üb. d. Bild. d. Oxalattaschen mit bes. Berücksicht. off. Pfl., Berner Diss., 1896, S. 24, Bot. Centralbl., 1896, LXVII.

zurückbleibenden Globoide mit stark verd. Essigsäure, dann bleiben die Oxalattafeln zurück, die sich in sehr verd. Salzsäure restlos auflösen. Vorher hatte aber Lüdtke (l. c. S. 20) eine Kristallmembran angegeben, die nach Herauslösen der Grundsubstanz mit verd. Kalilauge bei Einwirkung einer gesättigten Lösung von Natriumphosphat hervortreten sollte. Der Nachweis gelingt an entfetteten und mit Pikrinsäure fixierten Schnitten, die direkt in 0.5 % Salzsäure eingelegt werden. Auf diese Weise wird eine Strömung vermieden. Zur Beobachtung ist polarisiertes Licht und möglichst starke Vergrößerung unbedingt erforderlich (Tunmann).

Das reaktionelle Verhalten der einzelnen Bestandteile der Aleuronkörner und die benutzten Reagentien sind in umstehender Tabelle zusammengestellt. Es empfiehlt sich den entfetteten Schnitt zunächst auf dem Objektträger eintrocknen zu lassen und das Reagens erst dem trockenen Präparate zuzufügen. Es kommt hier auf die Konzentration der Reagentien an und der Gehalt derselben wird bei Einwirkung auf in Wasser liegende Präparate verändert. Die Wirkung des Reagens verfolge man unter dem Mikroskop. Das Verdunsten des Reagens wird durch einen Wachsrand verhindert. Zur Kontrolle werden die Präparate gleichzeitig in größeren Quantitäten des gleichen Reagens mazeriert. Doch ist nicht zu vergessen, daß die Körner und ihre einzelnen Einschlüsse durch den zur Entfettung benutzten Alkohol oder Äther ziemlich weitgehende Änderungen in ihrem reaktionellen Verhalten erleiden (Vines[1]), 1880). Es ist somit vorteilhaft, die Schnitte nicht zu lange in dem Entfettungsmedium zu belassen und die Entfettung dadurch zu beschleunigen, daß man die Schnitte in einem Fläschchen mit Alkohol oder Äther schüttelt. Es sei nochmals betont, daß sowohl Gesamthaut und Grundmasse als auch Globoide und Kristalloide bei den Körnern verschiedener Pflanzen eine verschiedene Zusammensetzung besitzen. Überdies hat Rendle[2]) gezeigt, daß die jugendlichen Aleuronkörner (Lupinus digitatus) sich anders zu Kochsalz, Salzsäure (1—10 %) und phosphorsaurem Kali (10 %) verhalten als die Körner der reifen Samen. Demnach werden die Reaktionen auch durch das Entwicklungsstadium der Samen beeinflußt. Daß die Dauer der Aufbewahrung (das Alter) von Einfluß ist, war S. 490 erwähnt.

Die mikrochemischen Reaktionen verlangen somit eine kritische Beurteilung nach jeder Hinsicht. Sie müssen nicht nur die Entfettungs-

[1]) S. H. Vines, On the chemical composition of the aleuron grains, Proc. of the Royal Soc. of London, 1880, XXX, S. 387.

[2]) A. B. Rendle, On the development of the aleuronegrains in the Lupin, Ann. of Bot., 1888, II, S. 161.

Tabelle der mikrochemischen Reaktionen auf Aleuronkörner.

Gesamthaut	Grundmasse	Globoide	Kristalloide	Kristalle
		Löslich in		
Kalkwasser (s. schwer) verd. Kalilauge [1] (schwer) verd. (1 %) Säuren [1] „ 1 % Chlorammon [2]) 1 % Magnesiumsulfat konz. „	Wasser, meist leicht oder doch unter Quellung sich zersetzend [3]) verd. Ammoniak „ Kalilauge (1 %) „ Essigs. (1 %) „ Salzs. (bis 3 %) „ u. konz. Kochsalz „ „ „ Magnesiumsulf. konz. Natriumphosphat [4]) „ Dinatriumphosph. Kalkwasser	organ. Säuren (Essigsäure, Weinsäure u. a.) verd. u. konz. Salzsäure konz. u. verd. Kochsalz „ „ „ Chlorammon „ Ammonsulfat „ Kaliummonophosphat konz. Natriumphosphat [4]) „ Dinatriumphosphat (nach längerer Zeit) 20 % Borax-Weinstein konz., mit Essigsäure anges. Kochsalz	verd. Kalilauge Kalkwasser (langsam) konz. Natriumphosphat „ u. verd. Chlorammon „ Kochsalz „ Essigs. (sehr schwer) 20 % Magnesiumsulf. (meist.) 3 % Salzsäure 1 % Essigsäure	Salzs. ohne Gasentwicklung konz. Kalilauge (sehr schwer)
		Unlöslich in		
Wasser (nur quellend) konz. Dinatriumphosphat konz. Ammoniumphosphat	20 % Borax-Weinstein (zum größten Teil) konz. Ammonsulfat „ , mit Essigsäure anges. Kochsalz	kalt. u. kochend. Wasser Kalkwasser verd. Kalilauge (meist.)	kalt. Wasser quillt, kochend. Wasser koaguliert konz. Dinatriumphosph. „ Kaliummonophosph. „ Ammonsulfat konz., m. Essigs. anges. Kochs.	Wasser verd. u. konz. Essigsäure verd. Kalilauge
Jodjodkal. schwach gelbl.	Jodjodkalium gelblich Vanillinsalzsäure rotviolett	Jodjodkalium farblos Isol. Globoide a. Magnes. u. Phosph. gepr. (S. 81, 121)	Jodjodkalium gelbbraun Vanillinsalzsäure violett	konz. Schwefels. Gipsnadeln

[1]) Nach Pfeffer unlöslich. — [2]) Es sind stets wässerige Lösungen gemeint. — [3]) Durch mehrtägige Mazeration mit Alkohol oder Äther (zur Entfettung), ebenso durch alkoholische Sublimatlösung (2 %) und durch Pikrinsäure wird die Grundmasse gehärtet und körnig gefällt und ist dann schwerer löslich, besonders in Wasser, Magnesiumsulfat und Chlornatrium. — [4]) Diese Angabe von Lüdtke konnte Gram nicht bestätigen.

methoden, sondern auch das Entwicklungsstadium und das Alter der Samen berücksichtigen. Jedenfalls sind verschiedene Literaturdifferenzen auf nicht genügende Berücksichtigung dieser Verhältnisse zurückzuführen. Zum Teil liegen aber Beobachtungsfehler vor. Bei den kleinen Gebilden ist die Entscheidung keineswegs leicht, ob sich die Grundmasse oder das Globoid gelöst hat oder nicht. Hier wird man entweder zu gefärbten Lösungen greifen oder größeres Gewicht auf die Feststellung des, durch die Lösung veränderten Brechungsexponenten legen müssen. Auf absolute Reinheit der Reagentien ist großes Gewicht zu legen.

Färbungen dienen bei den Aleuronkörnern nur zu Demonstrationspräparaten. Zuerst wurde Tannin benutzt (Overton, Lit. S. 484, 2). Dünne Schnitte werden mit absolutem Alkohol entfettet, auf 10 Minuten in eine verd. Tanninlösung gebracht, mit Wasser gut ausgewaschen und mit 1% Osmiumsäure behandelt: sie lassen sich nach dem Auswaschen in Glyzerin einschließen (Eiweißkristalle gelbbraun). Poulsen[1]) entfettet mit absolutem Alkohol, legt in eine 25% Tanninlösung (1 Stunde) und wäscht mit Wasser aus. Nun gelangen die Schnitte entweder in wässeriges Kaliumdichromat bis zur Braunfärbung und werden in Glyzerin eingebettet oder sie werden auf 1/2 bis 1 Stunde in 10—20% Eisensulfat bis zur tiefblauen Färbung gebracht, mit Alkohol entwässert, dann folgt Nelkenöl, Kanadabalsam.

Nach Krasser[2]) gelangen die Schnitte auf einige Stunden in eine alkoholische Pikrinsäure, die mit Eosin im Überschuß versetzt ist, werden mit Alkohol differenziert, mit Nelkenöl aufgehellt, in Kanadabalsam eingeschlossen (Grundsubstanz dunkelrot, Kristalloide gelb, Globoide farblos bis rötlich). Statt Eosin kann Nigrosin benutzt werden (Grundsubstanz blau, Kristalloide gelbgrün, Globoide farblos). — Gute Dauerpräparate gibt Säure-Fuchsin und die Methode von Strasburger-Chmielewsky (Prakt., 1897, S. 99), welche die Reaktion von Axenfeld[3]) benutzt (mit der noch Eiweiß 1:2000000 nachgewiesen werden kann). Die entfetteten Schnitte gelangen auf mehrere Stunden vor Licht geschützt in eine alkohol. Goldchloridl. (1 Tropfen 10% Goldchloridlösung auf 20 Tropfen absol. Alkohol) und verweilen dann ebenso lange bei Belichtung in Ameisensäure (5—10 Teile Ameisen-

---

[1]) V. A. Poulsen, Note sur la préparation des grains d'aleuron, Rev. gén. d. Bot., 1890, S. 547.

[2]) Fr. Krasser, Über neue Methoden zur dauerhaften Präparation des Aleuron und seiner Einschlüsse, Sitzb. zool.-bot. Ges. Wien, 1891, XLI, S. 42.

[3]) Axenfeld, S. une nouv. réact. de l'albumine, Journ. Pharm. d'Anvers, 1886, S. 317.

säure in 100 Teilen 50% Alkohol). Die Eiweißkristalle sind rosenrot bis violett. Die Schnitte kommen in verd., dann allmählich in konz. Glyzerin und werden in Glyzeringelatine eingeschlossen. — Andrews (Lit. 18,1) fixiert Samenstücke mit Chromosmiumessigsäure; ausgewaschen wird mit Wasser, entwässert mit Alkohol: dann folgt Chloroform, Paraffin, Herstellung von Mikrotomschnitten, Färbung dieser mit Safranin-Gentianaviolett-Orange und Einschließen in Balsam.

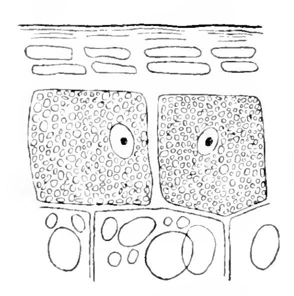


Fig. 113. Triticum (Querschnitt der Randschicht des Samens), einschlußfreie Aleuronkörner (*a*) in der Kleberschicht (Tunmann).

Die in den Kleberschichten enthaltenen kleinen (1—3 μ) Proteinkörner von Triticum sollen nach O'Brien[1]) aus einer, aus koagulierten Proteinstoffen bestehenden Membran und aus einem homogenen Kern bestehen, der die Natur der Globoide und der Grundmasse vereint (Fig. 113). Wasser, 1—10% Chlornatrium, 50% Alkohol, Gerbsäure, Osmiumsäure, Pikrinsäure lösen den Kern, aber nicht die Membran. Ammoniumchlorid, Dinatriumphosphat, Natrium- und Ammoniumkarbonat, Kalkwasser, Essigsäure. Mineralsäuren lösen Kern und Membran. 1% Kalilauge löst den Kern, die Membran bleibt selbst nach 5tägiger Einwirkung ungelöst. Durch längere Behandlung mit absolutem Alkohol (2 Monate) wird der Kern unlöslich in Wasser und Chlornatrium. Bei Secale führen die Körner 1—4 Globoide, die in Essigsäure löslich sind (Haberlandt, Lit. S. 425,2).

Stärke.

Die Stärke ist das erste sichtbare Produkt der Kohlensäureassimilation, sie zählt zu den wichtigsten Bau- und Reservestoffen. In den Assimilationsorganen finden wir in den Chlorophyllkörnern (S. 462) kleine Stärkeeinschlüsse, Assimilationsstärke. Die Assimilationsstärke wandert als Glykose nach den Bildungsstätten und den Reservestoffbehältern. In der Nähe der Baustätten und auf dem Wege dorthin scheidet sie sich bei eintretendem Nichtverbrauch in Gestalt kleiner Körnchen, die oft korrodiert sind, wieder aus (transitorische Stärke). In größerer Menge wird sie in den Reservestoffbehältern gespeichert, Reservestärke.

Die Stärkekörner entstehen nur in und an Chromatophoren und zwar so lange das Stroma funktionsfähig ist (Boehm, A. Meyer, H. Winkler u. a.). Sie bleiben meist von der (zuweilen allerdings sehr feinen) Masse der Chromatophoren eingeschlossen. Die Stärkekörner zeigen einen Kern (Bildungszentrum),

[1]) M. O'Brien, The proteids of wheat, Ann. of. Bot., 1895, IX, S. 172.

den die Stärkesubstanz in Schichten umgibt. Die Schichten sind Zuwachszonen, die sich durch verschiedene Dichte auszeichnen; substanzreiche und wasserarme Schichten wechseln mit substanzärmeren und wasserreichen ab. Liegt der Kern im Zentrum des Chromatophors, dann wachsen die Schichten gleichmäßig (zentrisch geschichtetes Korn), liegt der Kern mehr an der Seite des Chromatophors, so wird das Wachstum einseitig gefördert (exzentrisch geschichtetes Korn). Der Kern ist stets wasserreich, kann bei weiterem Wachstum resorbiert werden. Beim Eintrocknen zerreißt zuweilen die Stärkesubstanz und an Stelle des Kernes entsteht ein Hohlraum oder ein Spalt.

Wir unterscheiden einfache Körner (in einem Chromatophor entsteht nur ein Korn), zusammengesetzte Körner (an verschiedenen Stellen eines Chromatophors entstehen Körner, die sich bei weiterem Wachstum gegenseitig berühren); halbzusammengesetzte Körner sind zusammengesetzte Körner, die von gemeinsamen, die Teilkörner umgebenden Stärkeschichten umschlossen werden. Form und Größe der fast stets farblosen Körner sind diagnostisch wichtig und lassen sich mit Sicherheit oft nur an isoliert liegenden Körnern ermitteln. Die Größe (1—150 μ, selten größer) wird mit dem Mikrometer bestimmt (S. 55). Zur Bestimmung der Gestalt werden die Körner isoliert, dann klopft man mit der Nadel auf das Deckglas eines Wasserpräparates, wodurch die Körner ins Rollen kommen, oder man läßt zu einem Wasserpräparat etwas Alkohol zutreten, wodurch Strömungen erzeugt werden. Überwiegend sind die Körner rundlich, oft durch gegenseitigen Druck abgeplattet, seltener flach scheibenförmig oder knochen- oder hantelförmig (Euphorbiaceen, Nerium Oleander und Allamanda Schottii). Das absolute Gewicht der einzelnen Stärkekörner ist bei den verschiedenen Stärkearten naturgemäß recht verschieden. Ein typisches Stärkekorn wiegt bei Oryza sativa 0.(X)[1]18, Zea 0.(IX)82, Maranta arundinacea 0.(VIII)73, Triticum vulgare 0.(X)69, Solanum tuberosum 0.(VIII)75, Canna edulis 0.(VII)36 g. Diese Werte ermittelten Hartwich und Wichmann (Lit. S. 55) mit der Zählkammer (S. 55 ob.); die spezifischen Gewichte schwankten von 1.4696 (Triticum sativum) bis 1.5255 (Canna edulis).

Die Stärkekörner sind Sphärokristalle, die durch Apposition wachsen (F. Mirbel 1815, J. Fritzsche 1834, A. Meyer 1895, u. a.) und sich aus zahlreichen, sehr dünnen langgestreckten, nadelförmigen, radial angeordneten Kristallen, Trichiten, aufbauen. Sie kontrahieren sich bei Wasserentzug, quellen bei Wasserzufuhr, lagern Glyzerin ein und nehmen in ihren feinen Poren Farbstofflösungen auf, verhalten sich also wie die Sphärokristalle des Inulins, von denen sie sich aber durch ihre auf dem Amylosegehalt beruhende Lösungsquellung unterscheiden. Für den kristallinischen Aufbau der Stärkekörner spricht übrigens ihre Doppelbrechung im polarisierten Lichte. Bei gekreuzten Nicols zeigt jedes Stärkekorn, auch jedes Teilkorn eines zusammengesetzten Stärkekornes, ein schwarzes Kreuz. Da die Arme des Kreuzes

[1]) Die eingeklammerten römischen Zahlen zeigen die Anzahl der Nullen hinter dem Komma an.

sich im Kern schneiden, so dient das polarisierte Licht in Zweifelfällen zur Ermittelung des Kernes.

Nach H. Fischer (Lit. S. 196_2) sind die aufbauenden Substanzen kolloidaler Natur. In den wasserreicheren Schichten werden radial gestellte wasserführende Spalten angenommen, die beim Austrocknen verschwinden. Kraemer[1]) nimmt kolloidale und kristalloide Substanzen in verschiedenen voneinander getrennt gelagerten Lamellen an. Die äußerste Schicht wird aus einer von der übrigen Stärkesubstanz abweichenden Membran (Hüllhaut) gebildet. C. Naegeli (Stärkekörner, Zürich 1858) nahm an, daß die kleinsten Teilchen der Stärkekörner mit einer Wasserhülle umgebene Atomkomplexe (Micellen) wären. Diese sollten auseinanderweichen und zwischen ihnen neue Micellen entstehen. Das Wachstum sollte auf Intussuszeption beruhen. Bei ultramikroskopischer Betrachtung bestehen die Stärkekörner (Weizen, Kartoffel) aus konzentrischen oder exzentrischen Reihen von Micellen, zwischen denen sich optisch leere Reihen befinden. Der Kern scheint optisch leer zu sein. Die Micellarreihen sind am besten an der Peripherie der Körner zu sehen. Diese Beobachtungen von Gaidukov (Lit. S. 439) bestätigen zum Teil Naegelis theoretische Folgerungen. Bütschli[2]) schreibt den Stärkekörnern einen wabigen Aufbau zu.

Die Stärke besteht aus Stärkesubstanz, Wasser und geringen mineralischen Beimengungen. Sie ist ein organisiertes Kohlehydrat und, da sie bei der Hydrolyse (Enzymwirkung in einfache Zucker zerfällt (Maltose und Dextrose), ein Polysaccharid. Nach W. Naegeli[3]) besteht die Stärkesubstanz überwiegend aus Granulose, welche mit Jod reagiert, und aus Stärkezellulose, die als zartes Skelett bei der Einwirkung von Speichel oder verd. Säuren zurückbleibt. A. Meyer[4]) bezeichnet die eigentliche Stärkesubstanz als Amylose, der geringe Mengen Amylodextrin beigemengt sind. Die Amylose besteht hauptsächlich aus β-Amylose (Granulose Naegelis), die mit Jod reagiert und bei 100° mit Wasser flüssig wird und der geringe Quantitäten α-Amylose beigemengt sind, die nicht mit Jod blau wird und sich auch nicht mit Wasser bei 100° verflüssigen läßt. Nach Maquenne[5]) besteht die Stärke aus 80—85% Amylose und aus 15—20% verschieden kondensierten Amylopektinen. Beim Behandeln der Stärke mit kochendem Wasser löst sich die Amylose, während die Amylopektine nur aufquellen; sie sind es, die die Stärke schleimig und teilweise unlöslich in Alkali machen. Die Hülle der Körner der Kartoffelstärke besteht nach Gruzewska (Compt. rend., 1911, CLII, 785) aus Mineralsubstanz und Amylopektin, der Kern enthält Amylose. Die Stärke hat ein sehr hohes Molekulargewicht, Formel $(C_6H_{10}O_5)_n$ oder $(C_6H_{12}O_6)_n - (n-1)\,H_2O$.

---

[1]) H. Kraemer, Amer. Journ. Pharm., 1907, S. 217.

[2]) O. Bütschli, Über d. feineren Bau der Stärkekörner, Verh. nat. med. Ver. Heidelberg, 1893, N. F. V., Heft 1.

[3]) W. Naegeli, Beitr. z. näheren Kenntn. d. Stärkegruppe, 1874.

[4]) A. Meyer, Untersuchungen über die Stärkekörner. Wesen und Lebensgeschichte der Stärkekörner der höheren Pflanzen, Jena 1895.

[5]) L. Maquenne, Über die Stärke und ihre diastatische Verzuckerung, Bull. Soc. Chim. d. Paris 1906, XXXV, S. 1.

Der Wassergehalt der Stärkearten schwankt. Einige Stärkesorten (des Handels, lufttrocken) hatten nach Hartwich und Wichmann nachstehenden Wassergehalt: Triticum sat. 11.68, Oryza sat. 11.81, Zea 12.54, Maranta arund. 13.22, Solanum 14.71, Canna edulis 15.53%. Der Wassergehalt der Stärke in der lebenden Zelle ist ein anderer und steht im Zusammenhang mit dem Wassergehalt der Zelle. Bei längerem Liegen in Wasser quellen die Stärkekörner auf, womit bei der Angabe von Größenverhältnissen zu rechnen ist. Die durch Quellung bewirkte Größenzunahme ist nicht bei allen Körnern einer Pflanze gleich und hängt von dem Bau der einzelnen Körner ab. Bei Solanum fand ich Unterschiedswerte bis zu 4.3%[1]).

Im Gewebe sind die Stärkekörner infolge ihrer Gestalt und ihrer optischen Eigenschaften meist ohne weiteres zu erkennen. Selbst der Nachweis kleinster Stärkekörnchen, der einmal (besonders in Drogen und Herbarpflanzen) Schwierigkeiten bereiten könnte, ist mit Jodreaktionen leicht zu führen. Die Untersuchungen werden Größe und Gestalt der Körner ermitteln (s. ob.) und, wenn die Körner nicht zu klein sind, auf ihren Bau (Schichtung und radiale Struktur) eingehen.

Der Beweis, daß die Schichtung auf einem verschiedenen Wassergehalt der einzelnen Schichten beruht, läßt sich bei geschichteten Stärkekörnern in einfacher Weise durch Vergleich feuchter und völlig ausgetrockneter Körner erbringen, die in Kanadabalsam zur Beobachtung gelangen (Zimmermann, Mikrot. S. 220). Durch Ausfrieren verschwindet die Schichtung ebenfalls. Daher zeigt die Stärke der Chuña, einer aus gefrorenen Kartoffeln in den Höhen der Anden Südamerikas bereiteten Konserve, keine Schichtung; sie tritt erst bei längerem Liegen der Körner in Wasser wieder auf (Lit. S. 480, 1). Je schärfer die Schichtung hervortritt, um so höher ist der Wassergehalt der einzelnen Körner, dies geht aus den oben angegebenen Werten hervor. Oft ist die Schichtung schwer, zuweilen gar nicht sichtbar. Sie tritt im polarisierten Lichte oder nach längerem Liegen der Körner in Wasser schärfer hervor. Die Schichten lassen sich nach längerer Einwirkung von stark verdünnter Chromsäure (Weiss und Wiesner) besser erkennen oder wenn man Jodjodkalium in starker Verdünnung und ganz langsam einwirken läßt, wobei sich die wasserarmen Schichten färben (Binz)[2]).

Man kann ferner das Versilberungsverfahren von Correns[3]) mit

[1]) Genau bezeichnete Körner wurden lufttrocken und nach 5tägigem Liegen in Wasser gemessen.

[2]) Binz, Beitr. Morph. u. Entwicklung. d. Stärke, Flora, 1892, Zürcher Diss.

[3]) C. E. Correns, Zur Kenntnis der inneren Struktur der vegetabilischen Zellmembranen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1891, XXIII, S. 331.

Vorteil benutzen. Aus den Objekten (am besten lufttrockenen) werden die Stärkekörner durch Abschaben isoliert, in flachen Schälchen durch Auswaschen mit Wasser, das mehrmals abgegossen und erneuert wird, gereinigt und bei 50° ausgetrocknet. Die getrockneten Körner werden in einer Porzellanschale mit 2—5% wässer. Silbernitratlösung durchfeuchtet, oberflächlich abgetrocknet, darauf ohne Auswaschung in 1% Chlornatriumlösung gebracht und stark belichtet. Nach vollendeter Reduktion des entstandenen Chlorsilbers wird die Flüssigkeit sorgfältig abgegossen, die am Boden befindliche Stärke mit einem Glasstabe auf den Objektträger gebracht und nach dem Eintrocknen in Kanadabalsam eingeschlossen. Die größeren Körner zeigen meist in den stärker quellungsfähigen Schichten ausgeschiedene Silberpartikelchen oder eine homogene Graufärbung.

Mit dem schärferen Hervortreten der Schichten wird vielfach auch die radiale Struktur der Körner, die radiale Anordnung der Trichite, besser sichtbar werden. Hierzu kann Erhitzen in Xylol-Alkohol (Lit. S. 197. 4), dann außer verd. Säuren auch Kalziumnitrat [1]) dienen. Kartoffelstärke zeigt besonders gut die radiale Struktur nach Behandeln mit verd. Säuren bei nachfolgendem Aufquellen in Wasser (A. Meyer, Stärkekörner, S. 122). Bei der Maisstärke wird die radiale Struktur sichtbar nach dem Kochen (1/2 Minute) mit 1 ccm Chloroform, dem einige Tropfen Chromsäure zugesetzt sind (Buscalioni) [2]). Durch Chloroform wird die Einwirkung der Chromsäure beschleunigt.

Zu Strukturstudien sind im allgemeinen alle Mittel geeignet, die einen teilweisen Zerfall der Körner, eine mehr oder weniger tiefgreifende Umsetzung der Stärkesubstanz bedingen, also auch Enzyme und trockenes Erhitzen (Rösten). Da die Mobilmachung der Stärke in der Pflanze durch Enzyme (Diastase) bewirkt wird, so findet man während der Entleerung der Reservestoffbehälter stets Körner, die ihren Bau in klarer Weise erkennen lassen. Seit langem benutzt man als Übungsobjekte keimende Getreidekörner. Innerhalb der Zelle ist die Betrachtung der einzelnen Körner von verschiedenen Seiten schwierig und keimender Samen oder treibende Knollen stehen nicht jederzeit zur Hand. Daher verfolgt man die Einwirkung von Speichel oder Diastase (eine filtrierte und mit etwas Chloroform versetzte Lösung von 1 Teil Malz in 3 Teilen Wasser) auf isolierte Stärkekörner.

---

[1]) H. Kraemer. The structure of the starch grain. Bot. Gaz., 1902, XXXIV, S. 341.

[2]) L. Buscalioni, Sulla struttura d. granuli d'amido d. mais, Nuov. Giorn. bot. Ital., 1891, XXIII, S. 45.

Um die Diastasewirkung gut verfolgen zu können, müssen die Körner in einem dickflüssigen Medium (konz. Glyzerin)[1]) gerollt werden. Die Einwirkung zeigt sich nicht überall in gleicher Weise. Bei exzentrisch geschichteten Stärkekörnern (Solanum, Lilium candidum) erfolgt von außen nach innen und auf allen Seiten gleich stark ein Abschmelzen; bei Leguminosen und bei mit langen Spalten versehenen Körnern geht das Abschmelzen an der Außenseite so lange gleichmäßig von statten, bis der Spalt an einer Stelle geöffnet ist. Durch die Öffnung dringt das Enzym in den Spalt ein und wirkt nun ebenfalls von innen, die Risse werden erweitert, das Korn zerfällt in kleine Teilchen, die schließlich gelöst werden. Bei verschiedenen Gramineen (Hordeum, Secale, Zea) zeigt die Diastase an einzelnen Stellen eine vermehrte Tätigkeit, Löcher und Kanäle entstehen, die untereinander in Verbindung treten, bis der Zerfall des Stärkekornes erreicht worden ist. In Lösung begriffene Stärkekörner, welche ihre Struktur, besonders die radiale Stellung der Trichite gut erkennen lassen, treffen wir oft in den Mahlprodukten der Kunstmühlen an. Ein schönes Belegpräparat liefert der Belfaster Klebstoff (Fig. 114). — Ähnliche Erfolge erzielen wir mit dem Rösten. Das Röstprodukt der Kartoffelstärke, das Handelsdextrin, wird stets zur Verfügung stehen. Wir können uns aber aus jeder beliebigen Stärkeart das Röstprodukt selbst herstellen. Auf einem Deckglassplitterchen wird etwas Handelsstärke (oder Mehl) über der Flamme so lange vorsichtig erwärmt, bis die Masse eine tiefbraune Färbung (beim Halten des Deckgläschens gegen das Licht) angenommen hat. Das Deckglassplitterchen mit der Masse wird auf den Objektträger gelegt, die zusammengebackene Masse mit etwas Wasser angerührt und ein Deckglas aufgelegt. Ein Teil der Körner wird verkohlt sein; andere Körner werden sich kaum verändert haben, außer diesen werden wir stets Körner finden, die mehr oder weniger stark dextriniert sind (Fig. 115). Denn sowohl bei längerer Einwirkung von verd. Säuren oder von Diastase als auch beim Rösten wird die Stärkesubstanz in Amylodextrin übergeführt. Der Auflösungsvorgang der Stärke in der lebenden Zelle macht ebenfalls



Fig. 114. Stärkekörner, in Auflösung begriffen, zum Teil ihre Struktur anzeigend: *a*) aus Weizenmehl (Schweizer Handelsprodukt). *b*) aus der Firmas-Paste (Klebstoff) von Caw, Stevenson u. Orr. Belfast (Tunmann).

[1]) G. Krabbe, Unters. üb. d. Diastaseferment unt. spez. Berücks. seiner Wirk. a. Stärkek. in. d. Pfl., Jahrb. f. wiss. Bot., 1890, XXI, S. 520.

die Stufen Amylodextrin, Dextrin, Isomaltose, Maltose durch. Je weiter die Dextrinierung bei den einzelnen Körnern oder bei den einzelnen Schichten der Körner vorgeschritten ist, desto reiner werden bei Zusatz von Jodreagentien rote Färbungen entstehen (s. unten u. Amylodextrinstärke). Die gerösteten Stärkekörner zeigen bei Betrachtung in Öl, Anilin oder Pyridin im Kern eine Luftblase oder einen größeren mit Luft erfüllten Raum von zackigem Umriß, die Masse des Kornes erscheint etwas durchsichtiger, im übrigen treten Abweichungen von normalen Körnern nicht hervor. Die Umwandlungserscheinungen, die im allgemeinen die gleichen sind wie bei der Diastasewirkung, bemerken wir erst in Wasserpräparaten (Fig. 115).

Anderseits schwindet die Schichtung durch wasserentziehende Mittel u. a. (konz. Glyzerin, Benzol, fette und ätherische Öle, Pyridin, Anilin), sowie bei der Verkleisterung oder sehr starkem Aufquellen (Erwärmen mit Wasser, Alkalien, Chloralhydrat u. a.). Bei der Verkleisterung mit Wasser ist ein Erwärmen auf 50—80° erforderlich. Die Höhe der Temperatur ist für die einzelnen Stärkesorten verschieden (50—90°) und diagnostisch verwertet worden (Lippmann, Wittmack); in der Mikrochemie wird man hiervon absehen, da das genaue Einhalten bestimmter Wärmegrade etwas umständlich ist. Die Stärke von Oryza verkleistert vollkommen bei 61.2°, von Solanum, Zea, Castanea bei 62.5°, Triticum bei 67.5°, von Maranta arund. bei 70°. Bei der Verkleisterung quillt die Stärkesubstanz um das 25fache und mehr bis zur mikroskopischen Unkenntlichkeit, sprengt die Hüllhäute der einzelnen Körner, löst sich aber nicht auf; es bildet sich eine hyaline, strukturlose Masse, in der die zusammengeballten Häute sichtbar sind. Den gleichen Erfolg haben Alkalien, bei denen eine Anwendung von Wärme nicht erforderlich ist. Bei stärkereichen Geweben benutzt man diese Verfahren zum Aufhellen (S. 33).

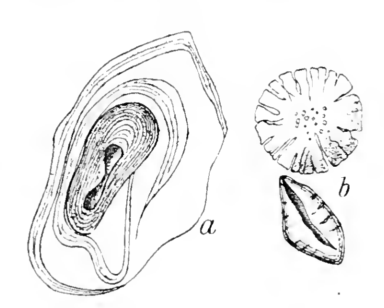


Fig. 115. Dextrinierte Stärkekörner, durch trockenes Erhitzen auf dem Deckglase erhalten, in Wasser liegend, *a*) Solanum, *b*) Triticum (Tunmann).

Die wichtigste Reaktion der Stärke ist die Blaufärbung mit Jod, die Jodstärkereaktion.

Die Jodreaktion wurde 1815, bald nach der Entdeckung des Jods, von Colin und Gaulthier de Claubry (Schweigg. Journ., 1815, XIII, 453) aufgefunden und ist für Stärke ungemein charakteristisch, da wir keine weiteren geformten Zellinhalte kennen, die in gleicher Weise reagieren Nur das in den Zellen gelöste Glykosid Saponarin (S. 391) wird mit Jod blau, ebenso Narcein (S. 297),

dann ein wasserlösliches Kohlehydrat, welches Bourquelot (Bull. soc. mycol., 1891, VII, 155) in Boletus pachypus Fr. auffand, von dem es aber noch ungewiß ist, ob es dem Inhalte oder der Membran entstammt. Einige Membranstoffe (Lichenin) werden durch Jod gebläut. Auch „das Gewebe der ganzen Krone“ von Paidania melastomacearum Racib. wird mit Jod blau (v. Höhnel, Sitzb. Wien. Ak., 1909, CXVIII 1, 830). Die Jodstärke ist, wie bereits Fritzsche 1834 angab, keine chemische Verbindung, sondern wahrscheinlich eine „feste Lösung“ (A. Meyer, Küster, Ber. chem. Ges., 1895, XXVIII, 783 u. a.).

Um eine rein blaue Färbung zu erzielen, ist es nötig, die Jodreagentien (Jod-wasser, -alkohol, -jodkalium) nicht in konz. Form anzuwenden. Man benutzt Jodjodkalium mit 1 % Jod oder eine Jodlösung, die man frisch bereitet aus 3 Tropfen Jodtinktur (1 : 10) und 2 ccm Wasser. Die beste Blaufärbung geben kleine Jodsplitterchen. Hierzu dient eine Jodverreibung (1 Tl. Jod, 5 Tle. Bimsstein). Bei zu großem Jodzusatz geht die Blaufärbung schnell in eine braunschwarze Färbung über. Die dunkle Färbung läßt sich durch Auswaschen, schneller durch etwas verd. Salzsäure in Blau überführen. Bei Einwirkung von Joddämpfen auf trockene Stärke (ein Jodsplitter wird in das trockene unter Deckglas liegende Präparat gebracht) tritt braunschwarze Färbung ein, die bei Wasserzusatz schnell in Blau übergeht. Läßt man Joddämpfe auf kleine Stärkehäufchen (die Stärke befindet sich auf einer Glasplatte, Jodkristalle werden in einem Uhrglas danebengebracht) einwirken, dann zeigen die verschiedenen Stärkesorten nach 24 Stunden bei makroskopischer Betrachtung eine verschiedene Färbung, Maisstärke schwarzviolett, Getreidestärke taubengrau, Kartoffelstärke gelbgrau, Sago milchkaffeefarben (Dubasc)[1]. Diese Farbentöne kommen durch zurückgehaltene Luft, Größe und Beschaffenheit der Körner zustande. Bringt man von den einzelnen Proben einige Körnchen in Wasser, dann tritt die typische Blaufärbung ein.

Da die Stärkesubstanz wechselnde Anteile an Amylodextrin enthält, welches mit Jodreagentien rötlich wird, so wechselt die Farbe der Jodstärke je nach ihrem Gehalte an Amylodextrin (blau, blauviolett, rötlich-blau). Diagnostisch wichtig ist die Eigenschaft der Jodstärke beim Erwärmen oder Erhitzen sofort farblos zu werden, um beim Erkalten die Färbung ohne erneuten Jodzusatz wieder anzunehmen. Die Jodstärkereaktion, die möglicherweise auf den Gehalt an Jodwasserstoff beruht, welcher in den Jodreagentien zugegen ist, wird durch einige Substanzen gehemmt: für den Stärkenachweis im Gewebe könnten in Betracht kommen: Gummiarabikum (Lit. S. 427, 1), Hydrochinon, Re-

[1]) Dubasc, Chem. Ztg., 1904, XXVIII, S. 1149.

sorcin, Pyrogallol (Czapek)[1], Tannin (Heintz)[2], in speziellen Fällen einige Farbstoffe (Hämatoxylin, Brasilin).

Die Fähigkeit, sich mit Jod blau zu färben, verlieren die Stärkekörner durch 1—10% Chromsäure oder Chromschwefelsäure. (Hierbei verlieren sie gleichzeitig die Fähigkeit sich mit kochendem Wasser zu verkleistern. C. O. Harz, Amylum in seinem Verhalten gegen Chromsäure, Bot. Centrbl., Beih., 1905, XIX, 45). Durch Kalilauge wird die Jodfärbung sofort aufgehoben, nachfolgender, sehr reichlicher Jodzusatz stellt sie wieder her, ebenso Zusatz von Säuren. Zerstört wird die Färbung durch Ammoniak, Salpetersäure, schweflige Säure, Schwefelwasserstoff, überschüssiges Chloral u. a. Durch Chloroform, Alkohol, Schwefelkohlenstoff u. a. kann man der Jodstärke das Jod entziehen, die Körner werden sofort farblos. Auch abnorme Temperaturen können die Blaufärbung verhindern. Němec (Percept. d. Schwerkraftr., Ber. bot. Ges., 1902, XX, 339) fand, daß sich die Stärke von Allium cepa (Wurzel), nachdem sie abnorm hohen oder niedrigen Temperaturen ausgesetzt war, mit Jod nur gelb färbte. Erst nach Vorbehandlung mit stark verd. Mineralsäuren erfolgte Blaufärbung durch Jod.

Die Jodreaktion tritt in gleicher Weise bei Stärkekleister ein. Kleisterballen finden sich in Drogen, die erhitzt oder abgebrüht werden (Tubera Salep u. Jalapae, Rhiz. Curcumae, chinesischen Rhusgallen, zuweilen in Tub. Aconiti und früher in einigen Sarsaparillen). Zum Nachweis der Stärke in Drogen empfiehlt Lagerheim[3]) Jodmilchsäure (einige Jodsplitter in heißer sirupdicker Milchsäure gelöst), durch die das eingetrocknete Gewebe seine natürliche Gestalt wieder annimmt. Jodchloral leistet die gleichen Dienste.

Die Bestrebungen, die blaue Jodfärbung der Stärke „haltbar“ für Dauerpräparate zu machen, sind noch nicht erfolgreich gewesen. In den Dauerpräparaten fehlt der für die Blaufärbung nötige Wassergehalt. Man ist bisher nur zu einer haltbaren Braunfärbung gekommen. Harz[4]) erzielt dauernde Braunfärbung mit Jodparaffin (Jod 1, Paraff. liquid. 100). Die Stärkekörner werden gelb bis braun. Die einzelnen Stärkesorten zeigen bei dem Verfahren ein etwas verschiedenes Verhalten. Die Stärke von Cassave bleibt farblos. Auch die Körner der gleichen Pflanze wechseln in der Farbe. Dies hängt jedenfalls mit der verschiedenen Struktur und dem Wassergehalt der einzelnen Körner zusammen. Zu Dauerpräparaten werden die Körner mit Jodjodkalium durchfeuchtet: man läßt auf dem Objektträger eintrocknen, dann

[1]) Fr. Czapek, Biochemie, 1905, I, S. 315.

[2]) E. Heintz, Jahresb. Agrikult. Chem., 1879, S. 499.

[3]) G. Lagerheim, Üb. d. Anwend. v. Jodmilchsäure z. mikr. Unters. v. Drogen usw., Svensk Farm. Tidskrift, 1901, V.

[4]) C. O. Harz, Jodparaffinöl, ein neues Mikroreagens und Einbettungsmedium, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1904, XXI, S. 25.

wird ein Tropfen Jodparaffin zugefügt und das Deckglas mit 10 % Gelatine umrandet. Rein blau gefärbte Körner habe ich nicht beobachtet. Fischer (Lit. S. 197, 3) läßt die mit alkoholischer Jodlösung überfärbten Körner an der Luft eintrocknen und bringt Kanadabalsam darauf. Der Überschuß der Farbe löst sich farblos im Kanadabalsam. die Körner bleiben dauernd braun bis gelb gefärbt. Etwas umständlicher ist die Methode Lagerheims[1]. Die mit Jodjodkalium gefärbten Körner werden mit Silbernitrat behandelt, der Sonne ausgesetzt und mit einem Hydrochinonentwickler entwickelt. Hierbei wird eine braune Färbung erzielt. Für Halbdauerpräparate ist eine Jodrohrzuckerlösung geeignet (konz. Rohrzuckerlösung mit 1 % Jod und etwas Kaliumjodid angerieben. Jod im Überschuß). Die Braunfärbung (nur einzelne Körner sind auf kurze Zeit blau) hält sich über ein Jahr, Deckglasumrandung ist nicht erforderlich (Tunmann. Lit. 486. 5). Die Körner gelangen direkt in die Zuckerlösung.

Zum Nachweis sehr geringer Stärkemengen bringt man die Körner zum Quellen und färbt sie mit Jod bei möglichster Entfernung störender Zellinhalte. Es ist vorteilhaft, die Präparate zuvor mit Alkohol von Farbstoffen (Chlorophyll) zu befreien oder Alkoholmaterial zu verwenden. An entfärbtem Material lassen sich sehr kleine Stärkeeinschlüsse der Chlorophyllkörner mit Jodjodkalium nachweisen. Man legt die Präparate in eine Jodjodkaliumlösung (1 : 50), in der bei starker Vergrößerung selbst sehr kleine Körnchen schwarz hervortreten, dann erhitzt man und verfolgt das Erkalten der Präparate unter dem Mikroskop, wobei das Wiedererscheinen der schwarzen Färbung recht augenfällig wird und die Körner sich gut von dem nur gelb gefärbten plasmatischen Inhalte und dem gelbbräunlichen Stroma der Chlorophyllkörner abheben. Besser wirkt Jodchloral (Lit. S. 33, 1). Etwas konz. Chloralhydratlösung (5 : 2) wird auf dem Objektträger mit einem Tropfen Jodalkohol (1 : 10) gemischt und das Präparat eingetragen. Eine Entfernung des Chlorophylls ist nicht unbedingt nötig, zuweilen aber dienlich. Das Reagens hellt schnell auf, bringt die Stärke (und Chlorophyllkörner) zum Quellen (Wirkung des Chloralhydrats), so daß selbst die kleinsten Körnchen durch Jod gebläut scharf hervortreten. Erwärmen beschleunigt und verstärkt die Wirkung. Mit Hilfe dieses Verfahrens läßt sich die Verteilung der Stärke in größeren Organen (Blättern) oder ihre ev. Abwesenheit leicht zur Anschauung bringen (Jodmethode von Sachs. verbessert von A. Meyer). Die betreffenden Gewebestücke werden in Jodchloralhydrat aufgekocht.

---

[1] G. Lagerheim, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1897, XIV.

Früher wurde das Verfahren von Boehm[1]) benutzt, bei dem die Stärke durch verd. Kalilauge zur Quellung gebracht und mit Jod gefärbt wird. Da Alkali die Jodfärbung verhindern kann, so muß Jodjodkalium im Überschuß zugefügt werden oder man muß vor der Färbung das Alkali mit Wasser gut auswaschen, ev. mit Essigsäure neutralisieren. Heinricher[2]) benutzt Javelle'sche Lauge. Die Präparate verbleiben 1—24 Stunden bis zur Zerstörung ihres übrigen Zellinhaltes in der Lauge, die zurückbleibende Stärke wird mit Jod gefärbt; unter Umständen ist vor der Färbung Kleisterbildung zu empfehlen. Da es aber Stärke gibt, die sich ziemlich leicht in der Lauge löst, besonders wenn nur Spuren zugegen sind, und man die Dauer der Einwirkung der Lauge für schwierige Fälle stets ausprobieren muß, so zieht man die anderen Verfahren vor.

Der Zusatz von Aufhellungsmitteln (Chloralhydrat) bei der Jodstärkereaktion ist auch in solchen Fällen notwendig, in denen Eiweißgebilde die Stärkekörnchen verdecken oder die Zellen große Mengen Eiweiß führen. Dann speichern die Eiweißkörper soviel Jod unter Braunfärbung, daß die Stärkereaktion verdeckt wird. Diese Bedingungen sind bei Algen gegeben, auch Treboux[3]) weist bei Cystococcus humicola (Gonidie) hierauf hin.

Färbungen werden bei Stärkekörnern, zu diagnostischen Zwecken wenigstens, nicht benutzt. Sie beruhen nach Salter (Lit. S. 467 ob.) auf Absorption, denn die aufgenommenen Farben sind durch Auswaschen leicht zu entfernen, während Fischer der Meinung ist, daß Lösungsvorgänge und chemische Reaktionen stattfinden. Jedenfalls ist mit der Färbung ein deutlicheres Hervortreten der Schichten verbunden. Vorzüglich benutzt man Färbungen zu Studien über die Entwickelungsgeschichte des Stärkekornes und seine Beziehungen zum Plastiden. A. Meyer färbte mit Methylviolett. Beim Nachbehandeln der gefärbten Stärke mit einer stark verd. wässer. Lösung von Kalziumnitrat schlägt sich der Farbstoff in den schwach lichtbrechenden, wenig dichten Schichten nieder. Vorteilhaft wird man Färbungen an Stärkekörnern der Kartoffel und von Canna indica studieren. Im allgemeinen sind (H. Fischer)[4]) zur Färbung geeignet wässerige Lösungen von: Fuchsin, Safranin, Chrysoidin, Jodgrün, Neutralrot, Gentianaviolett, Brillantgrün, Nilblau, Methylgrün, Thionin und Indulin (spirituslöslich). Indulin ist der einzige spirituslösliche Farbstoff, der färbt. Die genannten Farben werden sehr schnell und sehr reichlich aufgenommen.

[1]) J. Boehm, Stärkeb. d. Kresse usw., Sitzb. Wien. Ak., 1874, LXIX.

[2]) E. Heinricher, Verwendb. d. Eau de Javelle z. Nachw. kleinster Stärkemengen, Ztschr. wiss. Mikr., 1886, III, S. 213.

[3]) O. Treboux, Cystococc. humic., Ber. deutsch. bot. Ges., 1912, XXX, S. 69.

[4]) H. Fischer, Über die kolloidale Natur d. Stärkekörner u. ihr Verhalten gegen Farbstoffe, Bot. Centrbl., Beih., 1905, XVIII, S. 409.

Man läßt das Gemisch von Farbstoff und Stärke eintrocknen und behandelt mit Pikrinsäure. Dadurch werden die Farben als feiner Niederschlag fixiert. Andere Farben färben so wenig, daß sogar nach einigen Tagen die Körner sich nur wenig von der Farblösung abheben (Fuchsin S, Bismarckbraun, Hämatoxylin, Indigcarmin, Methylenblau u. a.). Selbst nach mehreren Wochen werden nicht aufgenommen: Carmin, Hessisch Purpur, Diamin-Echtrot, Kongorot, Anilinblau, Cyanin, Benzoschwarzblau, wasserlösliches Nigrosin.

Will man die Entwickelung der Stärkekörner studieren, dann müssen die Chloroplasten möglichst erhalten bleiben, das Gewebe muß fixiert werden. Versuchsobjekte sind Pellionia (Stengel, Blatt), Solanum tub. (junge Knollen), Adoxa moschatellina (Speicherschuppen, Rhizom), Phajus grandif. (Knollen), Canna (Rhizom). Fixierung mit Flemming, Sublimatalkohol (5%), konz. wässer. Pikrinsäure oder Pikrinsäure-Sublimat. Die Pikrinsäurelösungen werden mit Alkohol, die anderen Flüssigkeiten einige Stunden in fließendem Wasser ausgewaschen. Dann folgt Entwässern, Chloroform, Einbetten in Paraffin, Mikrotomschnitte, Objektträgerfärbung. Chloroplastenfärbung s. S. 466. Bei der Färbung der Stärke leisten Methylviolett oder Gentianaviolett gute Dienste. Hierbei werden die Stärkekörner violett, die Plastiden und das Cytoplasma rot. Die Färbung wird verbessert, wenn die Schnitte nach dem Abspülen „einige Sekunden lang mit ziemlich konz. wässer. Lösung von Orange G behandelt werden“ (Salter). Man kann ferner mit Flemming fixieren, dann 2—3 Tage mit einer durch Anilinwasser verd. Safraninlösung und 5 Minuten mit Gentianaviolett färben. Kraemer[1]) färbt zunächst die wasserreichen Schichten und das Zentrum mit verd. wässer. Gentianaviolett (Solanum) oder Safranin (Triticum) und läßt eine Nachbehandlung mit Jodlösung zur Färbung der übrigen Teile des Kornes folgen.

Weitere, besonders haltbare Färbungen haben C. W. Dodge (Durable stain f. starch., Journ. Micr., 1898, I, 131), J. H. Schaffner (Perm. st. f. starch, Journ. Micr., 1898, I, 181), E. Belzung (Nouv. rech. s. l'origine d. grains d'amidon et d. grains chlorophyll., Ann. d. sc. nat. Bot., 1891, XIII, 1) u. a. angegeben.

Näher angeführt sei noch das Tannin-Brechweinsteinverfahren (Rawitz). Die Objekte werden mit Pikrin-Eisessig-Schwefelsäure, Chromsäure oder mit Chrom-Osmium-Essigsäure fixiert. Bei Fixierung mit Osmiumsäure müssen die Präparate mit Terpentinöl oder mit Wasserstoffsuperoxyd nachgewaschen werden. Němec[2]) bringt Mikrotomschnitte nach vorheriger Überführung in Wasser auf 10—60 Min. in

[1]) H. Kraemer, Struct. of starch grain, Bot. Gaz., 1902, XXXIV, S. 341.
[2]) B. Němec, Inverse Tinkt., Ber. bot. Ges., 1906, XXIV, S. 528.

2% wässer. Tanninlösung, spült in Wasser ab (1 Min.) und legt sie 5—15 Minuten in 1½% wässer. Brechweinsteinlösung, dann Auswaschen (3 Min.), Gentianaviolett (30 Min.), Auswaschen (5 Min.), schließlich Terpentin, Xylol, Kanadabalsam. Die Präparate halten sich über 10 Jahre (Stärkekörner stark violett, Cytoplasma grau, Zellmembranen, besonders verschleimte, schwach violett).

Natriumsalicylat (wässerige Lösung 1 + 11) wirkt auf Stärkekörner (Lenz)[1]) in verschiedener Weise ein. Die Stärke kommt in einen hängenden Tropfen der Lösung und wird bei Zimmertemperatur der Dauerbeobachtung unterworfen. Roggenstärke ist nach 24 Stunden zum großen Teile, nach einer Woche gänzlich verquollen; nach längerer Zeit sind nur die zusammengefallenen Hüllen sichtbar. Weizenstärke widersteht längere Zeit, doch ist nach einer Woche das Polarisationskreuz ebenfalls nicht mehr zu erkennen und schließlich bleiben die entleerten Häute zurück. Hingegen verquellen von Maranta- und Kartoffelstärke innerhalb 24 Stunden nur wenige Körner im Salicylat und selbst nach 17 Monaten ist das Polarisationskreuz noch sichtbar. Man kann die Stärkearten einteilen in solche, die durch Salicylat in absehbarer Zeit nicht angegriffen werden, und in andere, die mehr oder weniger rasch gelöst werden. Nur die Kornsubstanz geht in Lösung, nicht die Hüllhaut. Die Beschaffenheit der Hüllhaut, ihre größere oder geringere Dicke, beeinflußt das schnellere oder langsamere Lösen der Kornsubstanz (der Sphärokristalle). Aus diesem Grunde lösen sich im allgemeinen größere Körner, deren Hüllhaut infolge der Spannung zarter ist, schneller als kleinere Körner. Die Reaktion hat diagnostische Bedeutung.

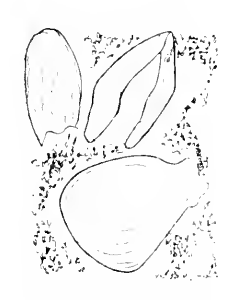


Fig. 116. Hüllen der Stärkekörner von Solanum tuberosum, mit Jod gelblich und entleerte Stärkesubstanz, mit Jod blau (Tunmann).

Die Hüllhaut der Stärkekörner läßt sich mit Jod und Schwefelsäure sichtbar machen. Am besten eignet sich hierzu Alkoholmaterial. Auch Drogen liefern gute Objekte. Die Körner quellen etwas, die Hüllmembran wird erst gelb, dann bräunlich, schließlich rötlich. Das nachstehende einfache Verfahren lieferte mir bessere Erfolge: Etwas Kartoffelstärke (Handelsprodukt) wird in Wasser unter Deckglas 2mal bis zur Blasenbildung erhitzt. Nach dem Erkalten sehen wir die verquollenen Hüllen, teils zusammengeballt, teils einzeln liegend. Nun

[1]) W. Lenz, Ein neues Untersuchungsverfahren für Stärkekörner, Apoth. Ztg., 1910, XXV, S. 778.

wird ein kleiner Tropfen Jodjodkalium zugesetzt (0,1 Jod : 100,0). In dem Untersuchungstropfen erscheint ein hellblauer, flockiger oder kleinkörniger Niederschlag, der zuvor (ohne Jodzusatz) kaum zu erkennen war. Der größere Teil der Hüllen ist, vorzüglich an der Peripherie, mehr oder weniger stark violett oder bräunlich gefärbt. Doch wird man stets einzelne, zwar nur an einer Seite, aber dort gänzlich gesprengte Hüllen finden, die nur eine schwache Gelbfärbung aufweisen (Fig. 116).

Erwähnt sei noch die sogenannte „braune Stärke" Lagerheims (Lit. S. 502, 3). Es sind Stärkekörnchen, die sich mit Jodmilchsäure bräunen und in den Kelchblättern verschiedener Anemonearten vorkommen (A. nemorosa u. a.).

Als **Amylinkörner** bezeichnet Hinze (Lit. S. 68, 7) kleine bald kugelige, bald ovale Gebilde oder glänzende Körnchen, die zerstreut im ganzen Protoplasma von Beggiatoa mirabilis auftreten, nur wenig größer als die anwesenden Chromatinkörner sind und sich in Speichel lösen. Da sie sich nicht in Wasser lösen, kann es sich nicht um Glykogen handeln. Die Körner werden deshalb als ein der Stärke nahestehendes Kohlehydrat angesprochen, weil die Zellen nach Behandeln mit Jodjodkalium im Protoplasma „zahlreiche Klümpchen, bald von mehr bläulicher, bald von mehr bräunlicher Färbung" zeigen (siehe auch S. 200, 2. Abs.).

Amylodextrinstärke.

Amylodextrin (Amylodextrinstärke, rote Stärke), von C. Naegeli 1858 (Stärkekörner S. 192) aufgefunden, hat die gleiche empirische Zusammensetzung wie Stärke, soll aber substanzärmer sein (A. Meyer, Ber. bot. Ges., 1886 und 1887, Y. Shimoyama, Diss. Straßb. 1886 u. a.). Amylodextrin entsteht aus Stärke durch Einwirkung von verd. Säuren und Enzymen (Speichel, Diastase) und kristallisiert in Nadeln, Tafeln und Sphärokristallen (W. Naegeli, Lit. S. 496, 3). Sechsseitige Tafeln und Prismen von Amylodextrin hat Schradinger (Centrbl. Bakt., 1908, XXVII$_2$, S. 98) aus verschiedenen Stärkesorten mit Hilfe des, die Stärkesubstanz lösenden Bacillus macerans erhalten.



Fig. 117. Amylodextrinstärkekörner. a) aus dem Arillus von Myristica fragrans (Macis), b) aus Sorghum vulgare (Frucht) (Tunmann).

Amylodextrin kommt ganz überwiegend in Form kleiner rundlicher, zuweilen länglicher Körner vor (selten gelappt, Fig. 117). Hanausek[1]) gibt gelöstes Amylodextrin neben Körnern in Form einer farblosen, durchsichtigen Masse im inneren Endosperm des Zuckermais an. Amylo-

[1]) T. F. Hanausek, Mais-Stud., Arch. Chem. u. Mikr., 1911, IV, Sep.

dextrinkörner finden sich vielfach: Chelidonium maj., Arillus (C. Naegeli, Lit. S. 496), Reisendosperm (Gris), Sorghumendosperm, Gentianablätter (A. Meyer, Dafert), Orchideenembryonen (Treub). Goodyera, Malaxis, Sweertia, Monotropa (Russow). Macis, keimende. stärkefreie Samen von Sinapis alba (Tschirch), Helianthemumsamen (Rosenberg), Lathraea cland. u. squam. (Tracheiden, Heinricher. Lit. S. 94.1), Isopyrumknollen (Mac Dougal), Rhinanthaceenhaustorien (Sperlich), Allium cepa. Wurzelhaube (Hušek), Anemona, Kelchblätter (Lagerheim. Lit. S. 503.1), Eleusine coracana (Mitlacher). Wo Stärke in Umwandlung begriffen ist, wird man auf Körner mit Amylodextrinreaktion fahnden können, vorzüglich dort, wo Stärke zur Bildung von Schleimmembranen verbraucht wird (Helianthemumsamen)[1].

Reines Amylodextrin färbt sich mit Jodreagentien rein rot. Der Ausfall der Jodreaktion hängt von dem Gehalt der Körner an Amylodextrin ab. Die Farben schwanken denn auch von violettrot bis rotbraun und braungelb. Jodalkohol färbt gelblich, Jodjodkalium rotbraun. Verschiedentlich beobachtet man Übergänge von blau bis rot. Die Blaufärbung zeigt noch reine Stärkesubstanz an und tritt oft in den inneren Partien des Kornes auf, so daß um einen blauen Kern eine mehr oder weniger rötliche Hülle sichtbar wird. Bei lange gelagertem Material, besonders bei alten Früchten und Samen, tritt die Reaktion erst dann typisch ein. wenn man das Material auf einige Zeit in Wasser eingelegt hat. Die Jodfärbung verschwindet beim Erwärmen, um beim Erkalten wieder hervorzutreten. Amylodextrinkörner quellen in Kalilauge, Chloralhydrat u. a., so daß man zum Nachweis sehr kleiner Körnchen, in gleicher Weise wie beim Amylumnachweis, Jodchloral benutzen kann. Man kann die Umwandlung der gewöhnlichen Stärke in Amylodextrin verfolgen, wenn man Stärkekörner längere Zeit in Speichel bei 50° beläßt. Die Körner färben sich mit Jod nach einigen Stunden nicht mehr blau, sondern violett bis weinrot, schließlich gelb.

Wenn wir von der Macis (Fig. 117a) und einigen anderen Objekten (s. oben) absehen. kommt dem Amylodextrin kein großer diagnostischer Wert zu, denn

[1]) Vergl. A. Gris, Bull. soc. bot., 1860, VII, 876. — A. Meyer, Arch. d. Pharm., 1883, CCXX. — T. W. Dafert, Ber. d. bot. Ges., 1887, V, 108. — M. Treub, Embryogénie d. quelq. Orchidées, 1879, 22. — E. Russow, Dorpater Sitzber., 1884, VII. — A. Tschirch, Ber. d. bot. Ges., 1888. VI, 138. — O. Rosenberg, Stud. üb. Membranschleime, Veröff. Ak. Stockholm, 1898, Sep. — D. T. Mac Dougal, A contr. to phys. of root tubers of Isopyrum biternatum, Minnesota Bot. Stud. Bull., 1896, 501. — Sperlich, Inhaltsst. d. Saugorg. d. Rhinanth., Bot. Centrbl., Beih., 1902, XI, 437. — Hušek, Bot. Centrbl., 1902, XC, 549. — W. Mitlacher, Exot. Gramineenfr., Ztschr. öst. Ap. Ver., 1901, XLV, Nr. 34 und andere.

der Gehalt der Körner an Amylodextrin ist ungemein schwankend und zum Teil auch von dem Entwicklungsstadium der betreffenden Früchte und Samen abhängig.

Florideenstärke.

Florideenstärke (Rhodophyceenstärke), schon von C. Naegeli (Lit. S. 496) und von van Tieghem (S. l. glob. amylacés d. Flor., Compt. rend., 1865, LXI, 804) beschrieben, ist in chemischer Hinsicht wenig erforscht[1]). Sie steht dem Amylodextrin höherer Pflanzen nahe, ist diesem vielleicht identisch. Florideenstärke kommt in kleinen rundlichen, eiförmigen oder ovalen Körnchen vor (Fig. 118). Abweichende Formen beschreibt Hansen (Lit. S. 475, 1) bei Chondriopsis, Chondria u. Laurencia. Ihre Entstehung ist nicht sichergestellt. Die Bildung im Cytoplasma wird von Fr. Schmitz (Chromat. d. Alg.) und Schimper (Lit. S. 473, 1) angenommen und in den Markzellen sind jedenfalls plastidenähnliche Gebilde mit Sicherheit nicht aufzufinden (Tunmann, An. u. Inh. v. Chondrus, Ap. Ztg., 1909, XXIV, 151). Florideenstärke wird meist als Reservestoff aufgefaßt (was Czapek [Bioch. I, 402] nicht als erwiesen betrachtet), doch deutet ihr Vorkommen in den Sporen darauf hin.

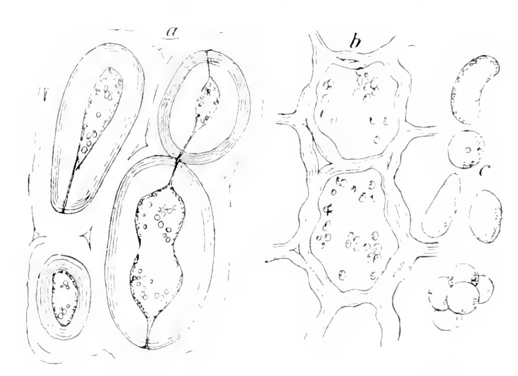


Fig. 118. Florideenstärke, a) Chondrus crispus, b) Alsidium spec. (Helminthochorton-Droge), c) einzelne Körner bei stark. Vergr. (Tunmann).

Im polarisierten Lichte verhält sich die Florideenstärke wie Amylum (bei gekreuzten Nicols ein orthogonales schwarzes Kreuz, van Tieghem). Mit Jodkaliumlösung[2]) wird sie gelbbraun bis braunrot, mit Chlorzinkjod weinrot. Doch kommen nach Belzung[3]) bei einigen Florideen Körnchen vor, die sich mit Jod blau färben. Auch bei Helminthochorton (Droge) fand ich wiederholt echte Stärke. Besonders jugendliche Körner weisen bisweilen Blaufärbung mit Jod auf. Die gelb- bis weinroten Farben wechseln in ihren Abtönungen sehr. Die Beschaffenheit des Materials (frisch oder getrocknet) scheint ebenfalls von Einfluß zu sein.

[1]) O. Bütschli, Not. üb. sog. Florideenst., Nat.-med. Ver. Heidelberg, 1903, N. F. VII, S. 519.

[2]) Rosanoff, Observat. s. l. fonct. et l. propriétés des pigments d. div. alg., Extr. d. mém. Soc. imp. Cherbourg., XIII.

[3]) E. Belzung, Rech. morph. et physiol. s. l'amidon et les graines de chlorophylle, Ann. d. Bot., 1892, V, S. 179.

Kolkwitz[1]) ließ Chloralhydrat einige Zeit einwirken und erhielt dann bei der Färbung mit Jodjodkalium zwei Farbentypen, den Laurenciatyp, der dem Kartoffeltyp nahesteht, und den Furcellariatyp, der mit dem Macistyp (mit der Jodfärbung des Amylodextrin der Macis) übereinstimmt. Die verschiedenen Farbentöne bei der Jodfärbung (Jod in Dampfform, in alkoholischer Lösung, als Jodjodkaliumlösung) wurden (auch makrochemisch) eingehend von Bütschli verfolgt. Da nun aber Farbentöne erfahrungsgemäß von den einzelnen Beobachtern selten übereinstimmend herausgefunden werden, so scheint hiermit kein greifbarer Erfolg gegeben zu sein, zumal vielfach Übergänge auftreten.

In ihrem Verhalten gegen heißes Wasser, Kalilauge, Chloralhydrat stimmt die Florideenstärke mit der Stärke überein. Durch heißes Wasser wird sie verkleistert. Leicht überzeugt man sich hiervon, wenn man einen mit Jodjodkalium gefärbten Schnitt erwärmt. Die einzelnen Körnchen bilden dann einen mehr oder weniger homogenen „Kleisterballen". Die Ballen bestehen aber nicht aus reiner Florideenstärke, wie die pharmakognostische Literatur für Carrageen angibt, sondern aus dem gesamten Protoplasten, der von der Stärke durchtränkt wird. Da man bei Chondrus mit Chlorzinkjod auch bei Abwesenheit von Körnchen eine Färbung erhält, so wäre zu untersuchen, ob die Florideenstärke zuweilen nicht auch in gelöster Form auftritt. In Kalilauge, Chlorzinkjod[2]) und in Chloralhydrat quellen die Körnchen. Mit Hilfe des Quellungsvermögens lassen sich (wie beim Nachweis kleinster Amylummengen) selbst Spuren von Florideenstärke durch nachfolgenden Jodzusatz nachweisen, beispielsweise in den Rindenzellen. Man kann hierzu Jodchloralhydrat (S. 503) benutzen. Die Florideenstärke teilt mit dem Amylum die Eigenschaft, die durch Jodreagentien erzeugte Färbung beim Erhitzen abzugeben (farblos zu werden), um sie beim Erkalten sofort wieder anzunehmen. — Ein Befund Flückigers (Pharmakogn., 1881, S. 254) verdiente weitere Nachforschung. „Werden dünne Schnitte des Carrageen in geschlossener Röhre einen Tag lang mit alkoholischer Kalilauge im Wasserbade erwärmt und nach dem Abwaschen mit Jodlösung (1. Jod, 3. Jodkalium, 500. Wasser) einige Stunden in Berührung gelassen, so färbt sich der gesamte Zellinhalt, nicht die Wandungen, aufs tiefste blau".

Die Florideenstärke mit ihren charakteristischen Reaktionen ist ein vorzügliches Mittel, um das feinste Pulver von Agar-Agar oder von Carrageen mikroskopisch nachzuweisen (im Agar-Agar finden sich stets Zellkomplexe der verarbeiteten Algen. Tunmann, Bemerk. üb. Agar-Agar, Ph. Zentrh., 1909, L, 223).

[1]) R. Kolkwitz, Beitr. z. Biol. d. Florideen, Helgol. wiss. Mitt., IV und: Ber. deutsch. bot. Ges., 1899, XVII, S. 247 (Gen. Vers. Heft).

[2]) E. Bruns, Inhaltskörp. d. Meeresalg., Flora, 1894, LXXIX, S. 159.

Wenig erforschte Bestandteile der Phaeophyceen.

Im Cytoplasma der Phaeophyceen kommen kleine (0,5—4 μ) Gebilde vor, über deren Natur trotz vielfacher Untersuchungen die Ansichten geteilt sind. Eine Literaturübersicht erscheint notwendig. Schmitz[1]) erwähnt in Wasser unlösliche Körnchen, die ein stärkeres Lichtbrechungsvermögen als der übrige Zellinhalt besitzen, und „mattglänzende hyaline Tröpfchen". Diese Bildungen (Fig. 119) reagieren nicht mit Jod. Doch ist Schmitz geneigt, sie für Kohlehydrate anzusprechen; sie werden als Phaeophyceenstärke (auch von Schimper) bezeichnet. Hansen (Lit. S. 475,1) spricht diese (und wohl auch ähnliche) Bildungen, die in Wasser unlöslich sind und in Glyzerin zusammenfließen, für Fett an; sie werden durch Kalilauge schaumig und lösen sich in 90% Alkohol und in Äther. Crato[2]) erhielt mit Vanillinsalzsäure und mit Piperonalschwefelsäure (je 1 Tropfen konz. Schwefels. u. alkohol. Piperonallös.) Rotfärbung und nimmt phenolartige Substanzen an (Phloroglucin), stellt aber eine eiweißartige Natur in Abrede. Er unterscheidet an den Bildungen eine Plasmahaut, die durch Reagentien gehärtet wird, sowie einen mit Wasser, Alkohol, Äther, Essigsäure, verd. Salzsäure und Kalilauge mischbaren Inhalt, der mit Anilinsulfat und Kaliumnitrit gelb, dann rot, mit Kaliumnitrit und Schwefels. braungelb wird. Die Bildungen sollen amöboid beweglich sein (Physoden)[3]).

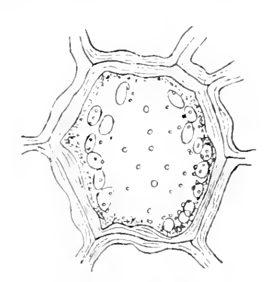


Fig. 119. Laminaria spec., Zelle mit Chromatophoren und kleinen diesen zum Teil auf- und anliegenden Physoden (Tunmann).

Andere Autoren halten die Bildungen für Kohlehydrate, so Clautriau[4]) (bei Himanthalia lorea) und besonders Hansteen[5]). Letzterer hält sie für stärkeähnliche Gebilde (Fukosan), die von den

[1]) Fr. Schmitz, Beitr. z. Kenntn. d. Chromatoph., Jahrb. f. wiss. Bot., 1884, XV, S. 1.

[2]) E. Crato, Morph. u. mikrochem. Unters. üb. d. Physoden. Bot. Ztg., 1893, LI, S. 157 u.: Üb. d. Hansteen'schen Fukosankörner, Ber. deutsch. bot. Ges., 1893, XI, S. 235.

[3]) Unter „Physoden" versteht man jetzt allgemein bläschenartige Gebilde im Cytoplasma; als Bezeichnung für die Phaeophyceengebilde kann der Ausdruck nicht mehr in Betracht kommen.

[4]) G. Clautriau, Les réserves hydrocarbonées des Thallophytes, Miscell. bot. dédiées au Prof. Giard, Paris 1899, S. 114.

[5]) B. Hansteen, Üb. d. Fukosan, als erstes scheinbares Produkt der Kohlensäureassimilation bei den Fucoideen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, XXXV, S. 611.

Chromatophoren in flüssigem Zustande ausgeschieden werden, im Cytoplasma aber erst zur vollen Größe gelangen und rundliche Formen annehmen. Sie färben sich mit sehr verd. Methylviolett. Pylaiella littoralis wurde 16 Stunden im Dunkeln in größerer Menge Seewasser gehalten, dem 0,0005% Methylviolett zugefügt war. Nach Hansteen soll Fukosan ein linksdrehendes, nicht direkt gärungsfähiges Kohlehydrat sein, dessen Bildung vom Licht abhängig ist. Ihm schließt sich im allgemeinen Hunger[1]) an, trotzdem er mit 1% Osmiums. in Meerwasser Schwärzung feststellt. A. Meyer erhielt bei Laminaria Volutinreaktion (S. 423). Berthold (Lit. S. 222, 3) spricht die Gebilde für „Tropfen einer Gerbstofflösung" an. Koch[2]) verneint einen Phloroglucingehalt.

Eigene Befunde[3]) und die nochmals vorgenommenen Nachprüfungen führen zu nachstehendem Ergebnis. Den bläschenartigen Gebilden fehlt (entgegen Crato und in Übereinstimmung mit Hansteen) eine Eigenbewegung. Sie sind nur an lebendem und gut fixiertem Material zu studieren. An getrocknetem Material sind sie meist nicht mehr sichtbar, da sie dann andere Inhalte, besonders die Chromatophoren, imprägnieren, so daß diese mit Vanillinsalzsäure reagieren. Die Rötung mit diesem Reagens ist auch von Bruns (Lit. S. 510, 2) angegeben worden. Sie tritt mit voller Schärfe zuweilen erst nach einiger Zeit ein. Die Vanillinsalzsäurereaktion ist aber hier in erster Linie eine Eiweißreaktion. Fixiert man lebendes Material mit Azeton-Meerwasser oder mit technischem Azeton, dann lassen sich Eiweißreaktionen (Jodreagentien) feststellen. Hierfür sprechen auch die Befunde von Crato, denn dieser betont, daß die Reaktionen mit Vanillinsalzs., rauchender Salpeters., Millon und Zucker-Schwefels. in gleicher Weise bei allen untersuchten Fucoideen eintreten, daß aber „gegen andere Reagentien, wie Osmiums., Eisensulfat, Eisenchlorid, Kaliumdichromat sich die Physoden der einzelnen Arten verschieden" verhalten (Bot. Ztg., 1893, S. 190). Aus Phloroglucin (Crato) kann der Bläscheninhalt deshalb nicht bestehen, da dieses mit Eisenchlorid blau wird, während die Bläschen sich nur schwach gelbbraun damit färben.

Des weiteren enthalten die Bläschen wechselnde Mengen an Gerbstoff, denn die Gerbstoffreaktionen fallen sehr schwankend aus.

---

[1]) F. W. T. Hunger, Üb. d. Assimilationsprod. d. Dictyotaceen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1903, XXXVIII, S. 70.

[2]) L. Koch, Unters. üb. d. bisher für Öl oder Phloroglucin gehalt. Inhaltsk. d. Fucoideen, Diss. Rostock, 1896.

[3]) O. Tunmann, Z. Kenntn. d. Laminaria, Pharm. Zentralh., 1907, XLVIII, S. 241 u. Lit. S. 94₂.

Die Färbung mit Methylviolett ist in erster Linie eine „Lebendfärbung“. Kohlehydrate sind nicht zugegen. Die bis jetzt für die Gegenwart von Fukosan beigebrachten Befunde (auch die makrochemischen) sind nicht genügend und fußen wohl hauptsächlich darauf, daß die Bläschen aus den Chromatophoren hervorgehen. Sollen aber nur Kohlehydrate aus den Chromatophoren hervorgehen (vergl. S. 361 u. 375)? Ein Zusammenhang mit der Assimilation scheint allerdings nach den Verdunkelungsversuchen Hansteens zu bestehen.

Es ist angebracht, diese Bildungen bis zur endgültigen Erforschung kurz als Phaeophycin zu bezeichnen[1]).

In den Assimilationszellen der Dictyotaceen finden sich sehr kleine lichtbrechende Gebilde auf der ins Zelllumen ragenden Oberfläche der Chromatophoren und etwas größere Körper im Zelllumen. In den Speicherzellen treten außerdem noch größere stark lichtbrechende Kugeln auf. Letztere sollen die Fluoreszenz der Algen bedingen und Reservestoffe darstellen. Die kleinen Gebilde, „Inhaltskörper“, sollen sich nur „bei Anwesenheit der Phaeoplasten und im Lichte entwickeln“ (Hunger, Lit. S. 542, 1) und bei längerer Verdunkelung verschwinden. Zur Untersuchung müssen lebende, dem Meerwasser frisch entnommene Algen benutzt werden. Hansen (Lit. S. 475, 1) hielt Inhaltskörper und Kugeln für Fett, da sie sich in 1 % Osmiums.-Meerwasser schwärzen. Die Osmiumreaktion bleibt jedoch aus, wenn ganze Thallusstücke in Chloralhydrat, Eisessig oder Chromsäure einige Zeit gelegen haben. Die Inhaltskörper röten sich ferner mit Vanillinsalzs. (aber nur bei Material aus den Monaten Januar und Februar, Hunger). Die den Chromatophoren anhaftenden Gebilde reagieren weder mit Osmium noch mit Vanillinsalzsäure. Die Inhaltskörper sind in Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff und Benzol unlöslich und sollen sich nach Hunger in Wasser lösen (nach Hansen sind sie nicht wasserlöslich); sie färben sich mit Kaliumdichromat und speichern Methylenblau (1 : 500000). Bei Behandlung ganzer Pflanzen mit Ptyalin und alkalischer Trypsinlösung werden die den Chromatophoren anhaftenden Gebilde angegriffen, Myrosin wirkt auf die Inhaltskörper im Zelllumen ein, Pepsin auf die Kugeln. Die Inhaltskörper sind komplizierter Zusammensetzung, nach Hydrolyse mit verd. Schwefels. wird die Fehlingsche Lösung reduziert. Die großen Kugeln enthalten Fett.

[1]) Die Arbeit von H. Kylin, Über die Inhaltskörper der Fucoideen (Arkiv Bot., 1912, XI, S. 1) kam erst bei der Korrektur durch das Referat von N. Wille (Bot. Centralbl., 1912, CXX, S. 681) zu meiner Kenntnis, sie vermag an obiger Darstellung nichts zu ändern.

Die Bestandteile der Cyanophyceenzelle.

Im Zellinhalte der Cyanophyceen unterscheidet man verschiedene Gebilde, deren Natur noch strittig ist. Der Inhalt gliedert sich in einen gefärbten peripheren Teil, die sog. grüne Rinde, und in einen farblosen inneren Teil, den farblosen Zentralkörper. Rinde und Zentralkörper enthalten Einschlüsse, über deren Natur die Ansichten ebenfalls geteilt sind. Die Einschlüsse der Rinde heißen Cyanophycinkörner, die des Zentralkörpers Zentralkörner.

Der farblose **Zentralkörper** wurde von Hegler und Kohl (l. c.) als Kern angesprochen (Kernwand und Nukleolus fehlen). Sie gründeten ihre Anschauung auf mitosenähnliche Gebilde (Fixierungsmittel: Jodalkohol, Pikrinschwefels., 10% Formaldehyd, 1% Osmiums., Flemming, konz. alkohol. Sublimatl.). Nach Kohl soll sich der Zentralkörper mit Eau de Javelle isolieren lassen. Die mitosenähnlichen Gebilde nennt A. Fischer Pseudomitosen: sie treten auch an lebendem Material (Oscillaria tenuis, Anabaena. Symploca) ohne weiteres als weiße glänzende Massen hervor, die sich nicht mit Jod färben und in Wasser unlösliche Kohlehydrate darstellen (Kohlehydratmitosen). Nach A. Fischer ist der Zentralkörper ein mit Reservestoffen erfülltes Zentralplasma und ähnlich urteilt A. Meyer, der ihn für eine große mit zähflüssigem Eiweiß angefüllte Reservestoffvakuole hält. Nach den übereinstimmenden Befunden von A. Fischer, Olive, Phillips, Guilliermond[1]) und Gardner[2]) besitzt der Zentralkörper keine abgrenzende Membran. Doch sollen zuweilen feine Fortsätze strahlenartig die grüne Rinde (Fischers Chromatophor) durchsetzen und mit dem feinen protoplasmatischen Wandbelag in Verbindung stehen.

Zentralkörner sind kleine Gebilde des Zentralkörpers (teils kleine kuglige Gebilde, teils Pseudomitosen). Für eine Chromatinnatur dieser Bildungen treten ein: Guilliermond, Nadson, Olive, Phillips (unlöslich in künstlichem Magensaft), auch Zacharias („Zentralsubstanz", in verd. Salzs. scharf umschrieben und glänzend wie Nuklein des Lachsspermas, S. 420). A. Meyer (Lit. S. 423, 1) tritt für Volutin ein. Bütschli (Lit. S. 423, 2) hebt die Färbbarkeit mit roten Farbstoffen hervor („rote Körner"). Palla und Hegler bezeichnen sie als Schleimkugeln. Nach Kohl und Hegler lassen sie sich mit Alkohol, Jodalkohol, 4% Formaldehyd, Sublimat, Pikrins., Pikrinschwefels., Flemming und Hermann fixieren, nach Kohl sind sie

[1]) A. Guilliermond, Contribution à l'étude cytologique des Cyanophycées, Revue générale de Botanique, 1906, XVIII.

[2]) Gardner, Cytological Studies in Cyanophyceae, Univer. of California publications, Botany, 1906, II.

resistent gegen Eau de Javelle und Ameisens. und werden mit Molybdänschwefels. (Ammonmolybd. 0.5, Wasser 1 ccm, Schwefels. 10 ccm) blau. Nach A. Fischer (Lit. S. 199, 9) reagieren sie nicht mit Jodreagentien; sie sollen aus Anabaenin bestehen[1]).

Anabaenin entsteht aus dem im Chromatophor der Cyanophyceen gebildeten Glykogen (S. 199 ob.) im Zentralkörper und bildet dort die Zentralkörner (kleine, kuglige Gebilde) und Pseudomitosen (chromosomenähnliche Knäuel und Körperchen). Es ist ein den Cyanophyceen spezifisches Kohlehydrat, farblos, stark glänzend, unlöslich in kalt. und kochend. Wasser, in Kochsalz, konz. Magnesiumsulf., 20 % Kupfersulf. und anderen Salzl., in konz. Ammoniak und konz. Essigs., in Alkohol, Äther, Xylol, Toluol, Chloroform, unverdaulich in künstl. Magensaft, farblos quellbar in Kupferoxydammoniak, unlöslich in stark verd. Mineralsäuren, sofort löslich in konz., langsam löslich in 5 % Kalilauge. Anabaenin färbt sich nicht mit Jod- und Carminlös., färbt sich schwach, doch nicht chromatinähnlich, mit Safranin, Gentiana, Jod- u. Methylgrün, mittelstark mit Delafieldschem Hämatoxylin, gut mit Methylenblau, stark mit Eisenalaunhämatoxylin. Durch Behandlung mit heißen 1 % Minerals. oder mit 5 % Oxals., Jodjodkalium, Chlorzinkjod wird Anabaenin partiell in Glykogen zurückverwandelt. Es ist optisch anisotrop und veranlaßt das Bild der sog. Gasvakuolen.

In Anabaena und Oscillaria fand A. Fischer ein Enzym, welches wahrscheinlich auch in anderen Cyanophyceen vorkommt. **Anabaenase** löst innerhalb 10—15 Minuten das Kohlehydrat Anabaenin. Es entsteht ein durch Jod weder färbbarer noch fällbarer Körper (Zucker). Anabaenase ist unempfindlich gegen Kochsalz- und Sodalös., empfindlich gegen starke Magnesiumsulfatlös., 5 % Monokaliumphosphat, 10 % Kalisalpeter und wird vernichtet durch 10 Minuten langes Erwärmen auf 90°, durch 0,1 %ige Lösungen von Formaldehyd, Essigs., Milchs., Karbols., durch 0,3 % Salzs. und durch längere Berührung mit 5 % u. 10 % Alkohol.

Als **Cyanophycinkörner** (Hieronymus, Lit. S. 484, 1) bezeichnet man kleine, im peripheren, gefärbten Teil liegende, kuglige Gebilde, die Schmitz Schleimkugeln (Lit. S. 482), Nadson Reservekörner, Zacharias Körner, Bütschli farblose Körner nennt, Phillips als Kohlehydrate (löslich in 4 % Salzs., 1 % Schwefels., Chloralhydrat,

[1]) Hierzu: Phillips, Comparative Study of the Cytol. a. Movem. of Cyanophyc., Trans. Bot. Soc., Pennsylvania, 1904, I, 237. — E. Zacharias, Über d. Cyanophyc., Abh. Hamb. Nat. Ver., 1900, XVI, 50. — F. G. Kohl, Organ. u. Phys. d. Cyanophyceenzelle, Jena, 1903. — R. Hegler, Unt. üb. d. Organ. d. Phykochromaceenzelle, Jahrb. f. wiss. Bot., 1901, XXXVI, 229. — E. Palla, Beitr. z. K. d. Baues d. Cyan.-Protoplasten, Jahrb. f. wiss. Bot., 1893, XXV, 511.

[2]) Glykogen wurde 1882 von Errera in Phycochromaceen aufgefunden.

färbbar mit Hämatoxylin) und Hegler als Eiweißkristalloide betrachtet. Nach Hegler verschwinden sie in Dunkelkulturen, treten bei Belichtung wieder auf, nach Fischer dienen sie wahrscheinlich zur Erneuerung des Phykocyans, nach Kohl finden sie sich weniger in lebhaft wachsenden Pflanzen. Für die Eiweißnatur werden angeführt: Reichl-Mikoschsche Reaktion (S. 411), die „Quellbarkeit und das intensive Speicherungsvermögen für Jod und Farbstoffe wie Carmin, Säurefuchsin, Safranin, Orange G., Eosin". Sie färben sich mit Pikrocarmin (Macallum), nach Alkoholbehandlung mit Essig- und Alauncarmin (Zacharias). Lebendfärbung mit Methylenblau gelingt nicht (Palla). Von den Angaben von Zacharias sei nur erwähnt, daß Millon, Jodglyzerin und Chlorzinkjod farblos lassen sollen. Hingegen färbt Jodjodkalium nach Vorbehandlung mit verd. Schwefels. (1 : 100) braun und nicht, wie Borzi angab, blau [1]).

Der Farbstoff der Cyanophyceen ist auf die peripheren Partien (sogen. grüne Rinde) beschränkt. Nach Palla, Hegler und Kohl besteht die Rinde aus Cytoplasma, in dem winzig kleine Chromatophoren eingebettet sind. A. Fischer (und auch Olive) [2]) nimmt einheitliche Chromatophoren an, deren Stroma die Gestalt eines geschlossenen Hohlzylinders besitzt. Die kleinen Einlagerungen sollen Grana sein. Mit Flußsäure lassen sich die **Chromatophoren** isolieren (auch bei Conjugaten, Diatomeen, Moosen, Triticum u. a.). Das protoplasmatische Stroma der Chromatophoren wird durch das Chlorophyll gegen die Einwirkung der Flußsäure geschützt. Wahrscheinlich bildet das Chlorophyll, das eine in Flußsäure unlösliche Substanz ist, bei der Ätzung einen ähnlichen Schutz für die Chromatophoren, wie ein Wachsüberzug für Glas. Auch ein extrahiertes Rohchlorophyll und Lezithin bewirken einen Ätzschutz. Die zu untersuchenden Algen werden mit Fließpapier abgetupft, in einen mit 30—40 $^0/_0$ Flußsäure (Mercksche Flußsäure ist 55 $^0/_0$) beschickten Platintiegel gebracht, der Deckel wird aufgelegt und mit dem Bunsenbrenner vorsichtig erwärmt, bis 3—4 kurze Aufstöße der Flüssigkeit hörbar werden. Nun wird das Material mit Platindraht herausgenommen und in einer großen Schale mit ruhigem Wasser gut ausgewaschen (bis 24 Std.). Die Algenfäden bleiben ganz, da die Zellulose nicht zerstört wird, das Plasma

[1]) Vergl. hierzu: G. Nadson, Bau d. Cyan.-Protoplasten, Bot. Centralbl., 1895, LXIII, 238. — E. Zacharias, Üb. d. Cyanoph., Jahrb. Hamb. wiss. Anst., 1904, 47. — H. Zukal, Bau d. Cyan. u. Bakt., Ber. d. bot. Ges., 1896, XIV, 331. — A. Borzi, Note alla morph. e biol. delle alghi ficocromacee, Estr. d. Nuovo Giorn., Bot. Ital., X.

[2]) E. W. Olive, Mitotic division of the nuclei of the Cyanophyceae, Beih. Bot. Centralbl. 1904, XVIII, Heft 1.

ist gelöst. Behandlung mit kalter Flußsäure (10—30 Minuten) ist weniger vorteilhaft, da nicht alles Plasma gelöst wird. Die Chromatophoren können gefärbt werden. Zur Färbung dienen am besten Lichtgrün, Säurefuchsin, Gentianaviolett in 1—2% wässeriger Lösung, die Färbung dauert 2—4 Stunden. Bei zu langer Färbung färben sich die Zellwände mehr oder minder mit und lassen sich beim Entwässern in Alkohol schwer wieder entfärben.

Paramylon.

Paramylon, $C_6H_{10}O_5$, von Gottlieb[1]) 1850 in Euglena entdeckt und in größerer Menge dargestellt, soll bei der Hydrolyse Traubenzucker liefern. Seine Bildung ist nicht an die Gegenwart von Chromatophoren gebunden, es entsteht im Cytoplasma und ist wahrscheinlich ein Reservestoff[2]. In Dauerzuständen wird Paramylon gespeichert. Ein Verbrauch ist beobachtet worden während und kurz nach der Keimung der Dauercysten (Euglena grac.), bei Verdunkelung und beim Ergrünen der im Dunkeln gehaltenen Kulturen. (Zumstein, Lit. S. 467.)

Paramylon kommt nicht nur im Cytoplasma der Euglenen vor, sondern auch in Amöben und Cysten von Leptophrys vorax (Zopf in Schenks Hdb., 1887, III, 17). Die Paramylonkörner sind meist kurz stäbchenförmig oder flach scheibenförmig, seltener ringförmig (oft 6 μ lang, 3 μ breit). Sie zeigen teils deutliche ringförmige Schichtung, teils wird eine Schichtung erst bei Einwirkung von Quellungsreagentien u. a. (Chlorzink, Kalilauge, Formalin) sichtbar. Ein Schichtungszentrum fehlt stets. Die Gebilde sind sehr wenig erforscht. Von Jodreagentien werden sie nicht gefärbt; von 5% Kalilauge werden sie augenscheinlich nicht angegriffen, hingegen von 6% Kalilauge unter starker Quellung gelöst. Farbstoffe werden nicht gespeichert (Klebs, Lit. S. 473). Von Schwefelsäure (56% und stärker) werden sie gelöst (Bütschli), von Kupferoxydammoniak erst nach Monaten etwas angegriffen; durch Wasser werden bei 150° geringe Anteile herausgelöst.

Cellulinkörner.

Als Cellulinkörner bezeichnet Pringsheim[3]) eigenartige Körner in den Schläuchen der Saprolegnien und Achlyen, die bald die Gestalt

[1]) J. Gottlieb, Über eine neue mit Stärkemehl isomere Substanz, Ann. d. Chem. u. Pharm., 1851, LXXV, S. 51.

[2]) W. Khawkine, Rech. biol. sur l'Astasia ocellata et l'Euglena viridis, Ann. Sc. nat. Zool., 1885, 6. sér., XIX, S. 238. — O. Bütschli, Beitr. z. K. d. Paramylons, Arch. f. Protistk., 1906, VI, 197.

[3]) N. Pringsheim, Über Cellulinkörner, eine Modifikation der Cellulose in Körnerform, Ber. d. bot. Ges., 1883, I, S. 288.

rundlicher oder polyedrischer Plättchen besitzen, bald kugelförmig erscheinen und deutlich geschichtet sind. Kern und äußere Schicht scheinen von einer dichteren Substanz gebildet zu werden. Sie geben weder Stärke- noch Eiweißreaktion, lösen sich nicht in Alkohol, in Äther und in Alkalien, unter Deckglas nicht in Kupferoxydammoniak, sind aber leicht löslich in Schwefels. (1 + 1) und in nicht zu verd. Chlorzinklös. Pringsheim betrachtet die Substanz der Körner als eine Zellulosemodifikation, die der Fibrose von Frémy nahesteht.

Dictydinkörner.

Das bläuliche Plasmodium von Dictydium und das grünschwarze von Cribaria besitzen glänzende braunschwarze Körner, die de Bary zuerst auffand und die sich durch eine auffallende Resistenz gegen Säuren und Alkalien auszeichnen. Sie wurden von Jahn[1]) als Nebenprodukte des Stoffwechsels betrachtet, Dictydinkörner genannt und sollen den Cellulinkörnern (S. 517) nahestehen. Sie nehmen Farbstoffe aus dem Plasma auf und speichern Farbstoffe (Fuchsin, Gentianaviolett, Safranin, Rutheniumrot). Setzt man nach Fixierung mit Sublimatalkohol Fuchsin und Jodgrün gleichzeitig zu, dann wird das Plasma rot und die Dictydinkörner werden grün. Mit Safranin-Gentianaviolett werden die Dictydinkörner rot, das Chromatin der Kerne erscheint blau. Sie verhalten sich in dieser Hinsicht wie die Vakuolen der ruhenden Myxomycetenkerne. Mit Millon färben sie sich nicht (Plasma wird rot), mit Jod reagieren sie ebenfalls nicht oder (im Gegensatz zum Plasma) doch nur schwach. Kalilauge bringt sie zur Quellung, löst sie aber ebenso wenig wie konz. Schwefelsäure. — Weitere mikrochemische Prüfungen sind erforderlich.

Fibrosinkörper.

Die von Zopf aufgefundenen Fibrosinkörper sollen der Pilzzellulose nahestehen (?) und seien daher hier kurz erwähnt, trotzdem sie ganz ungenau erforscht sind und in neuerer Zeit von Foëx[2]) eine andere Deutung erfahren haben. Sie kommen (2—8 μ groß) im Cytoplasma der Conidien Podosphaera oxyacanthae und anderer Erysipheen

[1]) A. de Bary, Die Mycetozoen (Schleimpilze) II. Aufl., 1884. — E. Jahn, Myxomycetenstudien 1. Dictydium umbilicatum Schrader, Ber. d. bot. Ges., 1901, XIX, S. 97.

[2]) W. Zopf, Über einen neuen Inhaltskörper in pflanzlichen Zellen, Ber. d. bot. Ges., 1887, V, S. 275. — E. Foëx, Les „Fibrosinkörper" de Zopf et leurs radiations avec les corpuscules métachromatiques, Compt. rend., 1912, CLV, 661. Sie sollen aus Volutin hervorgehen und bei der Keimung der Conidien verschwinden.

vor und haben eine ganz eigenartige Gestalt (schalenartig, trichter-, zylinderförmig). Es ist angebracht, die Sporen zuvor mit Salpetersäure oder mit Kalilauge aufzuhellen oder sie durch Druck zu isolieren. Nachstehende mikrochemische Reaktionen werden angegeben: Sie sind unlöslich in Alkohol, Äther, Chloroform, Kupferoxydammoniak, Chlorzinkjod, Salpetersäure (selbst nach 48stünd. Einwirkung), kalter Kalilauge, schwer löslich in konz. Schwefelsäure. In heißem Wasser quellen sie zu rundlichen, in warmer Kalilauge zu unregelmäßigen Gebilden auf. Von Jodreagentien und von Osmium werden sie nicht gefärbt, Anilinfarben werden nicht gespeichert.

Elaioplasten und Ölbildner.

Das fette Öl entsteht im allgemeinen im Zellplasma (S. 155). Bei einigen Monokotylen findet es sich an plasmatische Gebilde gebunden, die wir Elaioplasten (Wakker, Lit. S. 116,1) nennen. Ähnliche Bildungen kommen bei niederen Pflanzen vor, treten regelmäßig bei Lebermoosen auf, bei Diatomeen[1] (auch gefärbt, können Arten und Genera charakterisieren, Lit. S. 483,2), Saccharomyces[2] (?) und wurden Ölbildner genannt. Wenn auch zwischen Elaioplasten und Ölbildnern Unterschiede bestehen, so ist doch bei beiden gemeinsam, daß das Fett oder eine fettähnliche Substanz an eine protoplasmatische Grundlage gebunden ist. Wakker hält beide Bildungen für identisch.

Die **Elaioplasten** sollen durch eine als Degenerationserscheinung zu deutende Aggregation der Leukoplasten entstehen[3]. Vor dem Absterben der Zellen, oft schon früher, werden sie resorbiert. Ganz junge Elaioplasten 1 mm langer Blütenblätter sollen ölfrei sein[4]. Ausgewachsene Elaioplasten gleichen im Aussehen emulsionsartigen Ölkörpern. Die anormale Plasmolyse (S. 448) zeigt, daß sie im Plasma liegen. Eingehender studiert sind die Elaioplasten von Vanilla planifolia (bis 10 μ groß, in der Nähe des Zellkerns in der Epidermis jüngerer Blätter und in den peripheren Teilen jüngerer Triebe), Ornithogalum pyramidale, Funkia coerulea[5], in den Haaren von Gaillardia, im Milchsaft einiger Pflanzen (Homalanthus populneus u. a., Molisch, Milchs.).

---

[1] O. Richter, Zur Physiologie der Diatomeen, 2. Mitt., Denkschr. Wien. Ak., 1909, LXXXIV, S. 660.

[2] Nach H. Will (Centralbl. f. Bakt., 1895, II, S. 760) sollen die Fetttropfen der Hefe ein Eiweißgerüst besitzen.

[3] R. Beer, On Elaioplasts, Ann. of Bot., 1909, XXIII, S. 63.

[4] W. v. Küster, Die Ölkörper der Lebermoose und ihr Verhältnis zu den Elaioplasten, Dissert. Basel, 1894.

[5] M. v. Raciborski, Über die Entwicklungsgeschichte der Elaioplasten, Akad. Krakau, 1893 u. Lit. S. 120,1.

Die Zusammensetzung der Elaioplasten (Eiweiß und Fett) schreibt den mikrochemischen Untersuchungsgang vor. Die Löslichkeitsverhältnisse werden festgestellt, Fett- und Eiweißreaktionen ausgeführt, sowie Färbungen. Das Fett löst sich in Äther, Alkohol, Chloroform, Azeton, Petroläther, Ätherweingeist, auch in Kalilauge und Kalilauge-Ammoniak, jedoch ohne Seifenkristalle zu geben. Es ist unter Deckglas unlöslich in Chloralhydrat (5 + 2) und in Eisessig. In konz. Schwefelsäure löst es sich nicht und fließt zuweilen zu größeren Tropfen zusammen. Nach Entfernung des Fettes (auch aus fixierten Elaioplasten läßt sich das Fett leicht herauslösen) gibt das Stroma deutliche Eiweißreaktion (Jod, Salpetersäure, Millon). Die bei Einwirkung verschiedener Reagentien sichtbar werdende, angeblich aus Eiweiß bestehende Hülle soll ein Kunstprodukt sein.

In lebendem Zustande lassen sie sich in 4 % Rohrzuckerlös. studieren. Zur Fixierung dienen Osmiums., 1 % Chroms., konz. wässer. Pikrins., 1 % Essigs. Wakker färbte mit Anilinblau-Alkannin (eine dunkelblaue wässerige Anilinblaulösung wird tropfenweise mit Alkannatinktur bis zur dunkelpurpurroten Färbung versetzt), Einwirkung 24 Stunden, Untersuchung in Glyzerin (Kern und Chromatophoren dunkelblau, Plasma hellblau, Fett rot, Elaioplasten dunkelpurpurn). Ferner: Fixierung mit Osmiums., Färbung mit Fuchsin-Jodgrün (ganz dunkle Lösung in 50 % Alkohol, Dauer 1—5 Min.), Untersuchung in Glyzerin (Zellkern rötlich-violett, Stroma rötlich, Fett schwarz, v. Küster). Methylgrünessigs. färbt die Elaioplasten violett, Zellkerne grün (Zimmermann). Eine verd., mit 1 % Essigs. oder 1 % Ameisens. versetzte Alkannalös., die man mit Jodgrün vereinigen kann, benutzt Raciborski. Durch den geringen Säurezusatz wird das Stroma genügend fixiert.

Die **Ölbildner** der Lebermoose wurden von den älteren Autoren als Inulin (Schacht), Harz (Gottsche), Wachs u. a. gedeutet (ältere Lit. bei W. Küster). Sie bestehen aus fettem Öl, Wasser und einer plasmatischen Grundsubstanz, kommen (mit Ausnahme der Sporen und der Rhizoiden) in allen Teilen der Lebermoose vor und sind aus Vakuolen hervorgehende Neubildungen (Garjeanne)[1]. Pfeffer[2]) spricht sie für Exkrete an, die Stahl (Pfl. u. Schnecken) für Schutzwaffen hält. Lohmann[3]) fand in der Trockensubstanz einiger Lebermoose 2,3—4,3 % Rohfett.

Die Ölkörper der Lebermoose (Fig. 120) färben sich mit den gebräuchlichen Farbstoffen (in 50 % Alkohol gelöst) und mit Osmium

[1]) A. J. M. Garjeanne, Ölkörper d. Jungermanniales, Flora 1903, XCII, 457.

[2]) W. Pfeffer, Ölkörper d. Lebermoose, Flora 1874.

[3]) Lohmann, Beitr. z. Chem. u. Biol. d. Lebermoose, Bot. Centrbl., Beih., 1903, XV, S. 248.

leicht. Der Färbung geht vorteilhaft eine Härtung durch Eintauchen in 1 % Chromsäure ($^1/_2$ Min.) oder in 1 % Osmiums. voran. Letztere braucht beim nachfolgenden Färben nicht ausgewaschen werden. Überfärbte Präparate werden in 50 % Glyzerin ausgewaschen. Etwa anwesender Gerbstoff (Marchantiaceen) ist bei Osmiumbehandlung durch längeres Kochen der Schnitte mit Wasser zu entfernen. Die Ölmassen lösen sich schnell in Petroläther, Azeton, Äther, Chloroform, Xylol, Benzol, Schwefelkohlenstoff, Nelkenöl, Eisessig, Chloralhydrat, Alkohol, auch in 40 % Alkohol. In Säuren sind sie unlöslich und geben mit Kalilauge oder Kalilauge-Ammoniak niemals Seifenkristalle (v. Küster, Lohmann). Durch Kochen mit Wasser und Erhitzen auf über 100° verschwinden die Öle nicht (kein ätherisches Öl), anderseits bleiben sie nach Pfeffer bei 5—7° noch flüssig (kein Wachs). Die Hülle der Ölkörper besteht nach Garjeanne wahrscheinlich aus gerbsaurem Eiweiß. Sie läßt sich bei den Jungermanniaceen am besten mit einer konz. wässer. Pikrinsäurelös. härten und bleibt dann nach erfolgtem Lösen des Öles mit verd. Alkohol erhalten. Mit Methyleosin-Gentianaviolett in 50 % Alkohol färbt sie sich rotviolett. Sie ist aber ein Kunstprodukt, entstanden aus Gerbstoffen des Zellsaftes und aus Eiweißsubstanzen der Ölkörper. Andrews (Lit. S. 18, 1) benutzt zum Nachweis die Zentrifugalkraft, die spez. schweren Ölkörper sammeln sich in den zentrifugalen Enden der Zellen an.

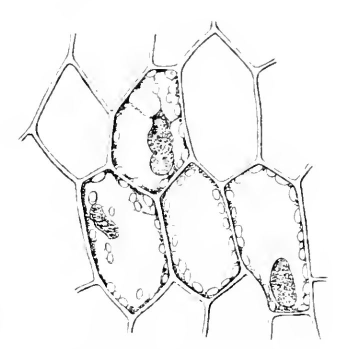


Fig. 120. Marchantia spec. (Flächenschnitt), Ölbildner (Tunmann).

Elaioplasten und Ölbildner zeigen nachstehende Abweichungen: Das Öl der Ölkörper der Lebermoose ist in Eisessig und Chloralhydrat unter Deckglas löslich, dasjenige der Elaioplasten nicht. Doch wird man diesem Verhalten kein allzu großes Gewicht beilegen können, zumal bei den einzelnen Gattungen Abweichungen in der Zusammensetzung der Öle zu bestehen scheinen. Vielleicht halten die Ölbildner der Lebermoose andere Körper (Kohlenwasserstoffe) im Öle in Lösung. Das Stroma der Elaioplasten läßt sich fixieren und gibt deutliche Eiweißreaktion, das Stroma der Ölbildner nur schwache. Weit größer ist der Unterschied in biologischer Hinsicht. Die Elaioplasten werden vor dem Absterben der Zellen resorbiert, die Ölkörper bleiben unverändert.

Ölartige Gebilde in der Epidermis von Potamogeton-Arten, die Lundström (Bot. Centrbl., XXXV. 177) als Elaioplasten anspricht,

lösen sich nach Lidforss (Lit. S. 449, 2) bereits in 10% Alkohol und führen aromatische Aldehyde (Rotfärbung in den peripheren Zellen von Blattstücken mit Fuchsin-schwefliger Säure). Die von Golenkin (Lit. S. 81, 1) in Sebdenia aufgefundenen Gebilde führen einen anorganischen Körper (Ascheskelett. Kalzium, Oxalsäure, Phosphorsäure fehlen), geben aber an Alkohol, Äther, Chloroform u. Essigsäure keine Bestandteile ab. Die von Berthold (Lit. S. 254, 4) in Florideen beschriebenen Gebilde hält Hansen (Lit. S. 475, 1) für Glykogen, Golenkin für Elaioplasten, da sie sich mit Toluidin-Seewasser färben und in Essigsäure, Äther, 50% Alkohol lösen. Durch Chloralhydrat und Kalilauge treten Tropfen aus, Osmium färbt braun, Jodjodkalium gelbbraun. Tschirch (Handb. d. Pharm., 1910, II, 296) fand in Laminarien wulstig-traubige Gebilde, die der Wand anhängen, bei Zutritt von dest. Wasser ineinanderfließen, platzen und kleine Öltropfen zurücklassen.

Plasmodesmen.

Von Tangl wurden 1879 im Endosperm verschiedener Samen zarte Plasmafäden aufgefunden, welche die Plasmakörper benachbarter Zellen verbinden. Sie wurden später allenthalben auch in den vegetativen Teilen der Pflanzen, meist die Schließhäute der Tüpfel durchziehend, entdeckt, so daß mehrfach die Ansicht ausgesprochen wurde, daß alle Protoplasten einer Pflanze durch Plasmafäden, durch Plasmodesmen (Strasburger), in Verbindung stehen. Die Plasmodesmen dienen wahrscheinlich der Reizleitung (und Leitung der Enzyme?); ob sie der Nährstoffleitung dienen (Pfeffer, Pflz. Phys., 1897, I, S. 97), erscheint noch nicht sicher. Sie entstehen unabhängig von der Zellteilung und werden sehr frühzeitig angelegt (vor Bildung der ersten sekundären Wandlamellen). Mit den ausgesponnenen mittleren Teilen der Zellplattenelemente stehen sie in keinem Zusammenhang. Die Plasmodesmen gehören der Hautschicht des Protoplasten an.

Kuhla[1]) verfolgte die Plasmodesmen in der einjährigen Achse von Viscum album und gibt eine graphische Darstellung der Verteilung der Tüpfel und Plasmodesmen. Nach den Milchröhren führen Plasmodesmen, nicht aber nach den Interzellularen. Durch die Außenwände der Sezernierungszellen der Epidermaldrüsen gehen nach Tunmann (Lit. S. 222, 4) in den Sekretraum ebenfalls keine Plasmodesmen (die Ansicht Pfeffers von der Sekretleitung der Plasmodesmen erscheint fraglich). Bei den Außenwänden der Ranken konnte Pfeffer[2]) keine Plasmodesmen ermitteln, die von Gardiner in den Außenwänden von Tamus com. und Lilium mart. angegebenen sind feine Kanäle (de Bary). Bei gepfropften Pflanzen wurden Plasmodesmen an der Verwachsungsstelle (Abies nob. und A. pect.) zuerst von Strasburger[3]) aufgefunden.

---

[1]) F. Kuhla, Die Plasmaverbindungen bei Viscum album. Bot. Ztg., 1900, LVIII, S. 29.

[2]) W. Pfeffer, Zur Kenntn. d. Kontaktreize, Tübinger Arb., 1881/85, S. 524.

[3]) Ed. Strasburger, Über Plasmaverbindungen pflanzlicher Zellen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1901, XXXVI, S. 493.

Beim Nachweis der Plasmodesmen muß man sich in erster Linie vor Verwechslungen mit Plasmaausfüllungen feiner Tüpfel hüten und darauf achten, daß wirklich Plasmaverbindungen vorliegen, welche die Zellwände oder die Schließhäute der Tüpfel durchbrechen. Im allgemeinen sind die Plasmodesmen ohne weiteres nicht zu erkennen. Ihr sicherer Nachweis hängt von ihrer Stärke und von der betreffenden Zellwand ab. Die Methoden müssen nach den Verhältnissen abgeändert werden. Zur Anwendung gelangen Färbungen, die mit Fixierung und wenn nötig mit Quellungsmitteln verbunden werden.

Sehr leicht sind die Plasmodesmen ohne Anwendung von Quellungsmitteln und ohne Fixierung im starkwandigen Endosperm vieler Samen zu erkennen. Auf alle Fälle sind zarte und entfettete Schnitte zu wählen. An solchen sieht man sie bei Strychnos-Arten ohne weitere Präparation. Schärfer treten sie nach Färbungen hervor. Die Schnitte (Phytelephas, Strychnos, Physostigma u. a.) gelangen auf 5–10 Minuten in 0.5% Farbstofflösungen und werden in Glyzerin untersucht. Die Plasmodesmen werden deutlich gefärbt und erscheinen als homogene Fäden. Kohl[1]) empfiehlt Methylviolett und Safranin „genügend“ lange „in möglichst dünnen Lösungen“ anzuwenden. Benutzt man Jodreagentien, so werden sie gefärbt und gleichzeitig fixiert: man beläßt die Schnitte einige Tage unter Deckglas[2]) in Jodjodkalium (0.17 J, 0.1 KJ, 20.0 H_2O) oder in Chlorzinkjod. Die Färbung wird verstärkt, wenn man etwas Jod zur Ausscheidung bringt. Moore[3]) legt Endospermschnitte in alkoholische Jodlösung, die mit Wasser versetzt ist. Die Plasmodesmen erscheinen dunkler gefärbt als die Zellwand. Die Jodausscheidung kann auch durch Chlorzinkjod bewirkt werden (Fig. 121 a).

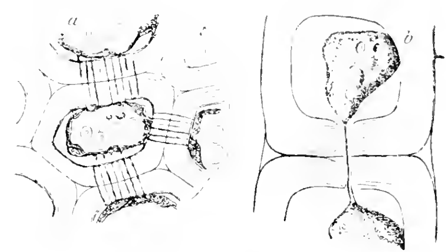


Fig. 121. Plasmodesmen. a) Strychnos nux vomica (Endosperm, frisches Material, entfettet, dann Jodjodkalium-Chlorzinkjod), die Plasmodesmen sind nur zum Teil erhalten: b) Arctostaphylos uva ursi (Blattstiel, subepidermales Parenchym). Behandlung nach dem Pyoktanin-Verfahren (Tunmann).

[1]) F. G. Kohl, Dimorphismus der Plasmaverbindungen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1900, XVIII, S. 364.

[2]) Ed. Tangl, Über das Endosperm einiger Gramineen, Sitzb. Wien. Akad., 1885, XCII, 1, S. 72.

[3]) M. Moore, Observations on the continuity of Protoplasm., Journ. Linn. Soc. Bot., 1886, XXI, S. 595.

Zu den leicht sichtbar zu machenden Plasmaverbindungen zählen die der **Siebröhren.** Siebplatten färbte schon Hanstein mit alkoholischer Jodlösung (1 : 10) und verstärkte die Färbung durch nachfolgenden Zusatz von Chlorzinkjod. Russow[1]) gebrauchte zum Plasmodesmen-Nachweis Mischungen von Jodjodkalium mit Chlorzinkjod. Zimmermann (Mikrot. S. 240) färbte Cucurbitaceen nach vorausgegangener Fixierung durch kochendes Wasser und bei Benutzung von Mikrotomschnitten mit Altmanns Säurefuchsin. Strasburger benutzt Alkoholmaterial, fertigt Freihandschnitte und färbt direkt mit Anilinblau. Versuchsobjekte sind Tilia, Vitis, Aristolochia. Cucurbita, besonders Kraunhia floribunda, die kurze Glieder „und fast senkrecht zu deren Verlauf orientierte Siebplatten" hat, ein wesentlicher Vorteil. Da diese Methoden bei den Siebröhren meist zum Ziele führen dürften, so ist das Verfahren Gardiners (Lit. S. 444, 3) entbehrlich: es wird eine Lösung von Hofmanns Violett (Methylviolett B. extra, Kahlbaum) in konz. Schwefelsäure verwendet, in welche die Schnitte auf etwa eine Minute gelangen, um dann in viel Wasser ausgewaschen zu werden. Das Reagens ist von brauner Farbe und bräunt die Schnitte in der kurzen Zeit der Einwirkung nur wenig. Beim Auswaschen werden die Präparate grün, dann blau und schließlich behalten die Protoplasten und die Plasmodesmen eine violette Färbung. Zimmermann benutzt hierzu Alkoholmaterial. Feine Schnitte werden auf dem Objektträger mit Fließpapier abgetrocknet, mit einem Tropfen Methylviolett-Schwefelsäure bedeckt und das Deckglas aufgelegt. Nach 1—2 Minuten wird der ganze Objektträger in eine große Schale mit Wasser getaucht, worin er bis zum Violettwerden der Schnitte verbleibt. Gewöhnlich wird das Deckglas fortgeschwemmt. Doch bleiben einige Präparate immer am Objektträger haften, die zur mikroskopischen Prüfung herangezogen werden.

Entwicklungsgeschichtlich sind die Siebtüpfel und die Verbindungsfäden bei den Coniferen eingehend untersucht worden. Hill[2]) fixierte nach Gardiner (s. weiter unten) und färbte mit Safranin und Anilinblau. Im primären Zustande zeigen die Siebtüpfel in der Mittellamelle Pektin und Zellulose, in der Verdickung aber Zellulose. Die Tüpfel werden von Plasmodesmen durchsetzt. Letztere gehen in Schleimfäden über und enthalten Enzyme, welche die Zellulose in Callose überführt. Durch Safranin-Anilinblau werden die Schleimfäden rot, die Callusmassen blau. Doch ist das Alter der Fäden von Einfluß auf die Befunde.

[1]) E. Russow, Über die Verbreitung der Callusplatten bei den Gefäßpflanzen, Sitzb. Naturf.-Ges. Dorpat, 1883, VI, S. 63.

[2]) A. W. Hill, The histology of the Sieve-Tubes of Pinus, Ann. of Bot., 1902, XV, S. 575.

Wesentlich schwieriger gestaltet sich der Nachweis, wenn zarte Plasmodesmen vorliegen und die Zellwände sehr dünn sind. In solchen Fällen müssen neben den Färbungen und der Fixierung auch Quellungsmittel benutzt werden. Nach der Fixierung erscheinen die Plasmodesmen entweder homogen oder stäbig und körnig. Von 1 % Osmiumsäure werden die Plasmodesmen völlig homogen fixiert (A. Meyer[1]), weniger gut fixiert konz. Jodjodkalium (3.0 J, 3.0 KJ, 20.0 H_2O) und Kaliumwismutjodid[2]). Hingegen fixiert schwächeres Jodjodkalium (1.0 J, 1.0 KJ, 200.0 H_2O) die Plasmodesmen körnig. Letzteres, das meist benutzt wird, wirkt bei nachfolgender Färbung zugleich als Beize. Wie Jod wirkt konz. Pikrinsäurelösung. Bei Volvox fixiert gut eine 2 % Lösung von Chlorgoldnatrium und konz. Salpetersäure mit nachfolgendem Ammoniakzusatz[3]).

Die Färbungen werden teils durch Jod, teils durch Anilinfarben, Safranin, Methylviolett, Bayrischblau, Hämatoxylin und Pyoktanin bewirkt. Als Quellungsmittel dient vorzüglich Schwefelsäure, die nicht zu konzentriert benutzt werden darf. Als Übungsobjekte benutze man Tangentialschnitte von Samen und des primären Rindenparenchyms zentimeterstarker Zweige unserer Dikotylen. Allgemein gültige Vorschriften lassen sich nicht geben. Die Verfahren müssen von Fall zu Fall mehr oder weniger abgeändert werden. Nachstehend sind von den zahlreich vorgeschlagenen Methoden die hauptsächlichsten angeführt.

Hillhouse[4]) fixiert das Material mit Alkohol, bringt zarte Schnitte auf einige Minuten auf den Objektträger in verd. Schwefelsäure und läßt 20—48 Stunden konz. Schwefelsäure einwirken, ohne das Deckglas aufzulegen. Nach dem Auswaschen mit destilliertem Wasser wird mit Ammoniak-Carmin gefärbt, mit dem Deckglase bedeckt und in Glyzerin aufbewahrt. Die Zellwand ist gelöst, von der Interzellularsubstanz sind zuweilen Reste vorhanden. Durch die konzentrierte Säure werden naturgemäß feine Plasmaverbindungen verzerrt und zer-

---

[1]) A. Meyer, Üb. d. Meth. z. Nachweis. d. Plasmaverbindungen. Ber. deutsch. bot. Ges., 1897, XV, S. 166.

[2]) Nach folgender Vorschrift: 80 g basisches Wismutnitrat werden in 200 ccm reiner Salpetersäure, spez. Gew. 1.8, gelöst und 272 g KJ in wenig H_2O; die Wismutlösung wird langsam und unter Umschütteln in die Jodlösung gegossen, dann wird vom auskristallisierenden Salpeter abfiltriert und im braunen Glase aufbewahrt.

[3]) A. Meyer, D. Plasmaverbind. u. d. Membr. v. Volvox globat., aur. u. tert., m. Rücks. auf d. tier. Zell., Bot. Ztg., 1896, LIV, S. 188.

[4]) W. Hillhouse, Einig. Beobacht. üb. d. interzell. Zusammenh. v. Protoplasten, Bot. Centralbl., 1883, XIV, S. 89.

rissen werden. Bekannter ist die Methode von Russow (Lit. S. 440, 1). Die aus frischem Material hergestellten Präparate werden auf dem Objektträger mit Jodjodkalium (0.2 J, 1.64 KJ, 100.0 H_2O) gut durchtränkt und das Deckglas aufgelegt. Am Deckglasrande wird 1 Tropfen konz. Schwefelsäure mit 3 Tropfen verd. Schwefelsäure (3 + 1 Teil Wasser) zugesetzt und die Säure bis zur Schwarzblaufärbung der Präparate durchgesaugt. Nun wird das Deckglas abgehoben, die Säure ausgewaschen, indem man die Präparate auf dem Deckglase auf 3—5 Minuten in Wasser bringt und schließlich wird mit einer konz. wässer. Lösung von Bayrischblau oder Methylviolett (A. Meyer) gefärbt. Russow gebrauchte ein Anilinblau. Da bei diesem Verfahren auf dem Objektträger gearbeitet wird, so ist die mikroskopische Kontrolle, die unbedingt erforderlich ist, bequem durchzuführen.

Terletzki[1]) fixierte die Schnitte im Uhrgläschen mit Jodjodkalium, goß die Lösung ab, füllte auf einige Minuten mit Schwefelsäure (3 + 1 Teil Wasser) auf und färbte nach gutem Auswaschen mit einer konz. Lösung von Anilinblau. Die mikroskopische Kontrolle der Wirkung der Reagentien ist hierbei schwer durchführbar. In ähnlicher Weise verfährt Kienitz-Gerloff[2]). Seine Jodlösung ist für alle Methoden brauchbar (0.05 J, 0.02 KJ, 15.0 H_2O) und ebenso liefert die von ihm benutzte konz. wässerige Lösung von Methylviolett brauchbare Ergebnisse.

Die Vorteile der Methode von A. Meyer beruhen in der Anwendung einer möglichst verd. Säure, wodurch zu starke Quellung verhütet wird, in der ständigen mikroskopischen Kontrolle und in der Benutzung von Pyoktanin, einem Farbstoff, der beim Bezug zu Verwechslungen keinen Anlaß geben kann. Die Schnitte kommen auf einige Minuten in ein Uhrglas mit Jodjodkalium (0.1 J, 0.1 KJ, 20.0 H_2O) und werden mit einem kleinen Tropfen Jodlösung auf den Objektträger unter Deckglas gebracht. Nun wird am Deckglasrande Jod-Schwefelsäure zugesetzt (1 + 3 Teile Wasser, die Säure wird durch Stehen über etwas Jod mit Jod gesättigt), wodurch das Präparat dunkler gefärbt erscheint, die Quellung der Membran aber sehr gering ist. Jetzt wird in gleicher Weise ein kleiner Tropfen Pyoktaninlösung (1.0 Pyoktanin coeruleum Merck, 30.0 Wasser) zugefügt und die Einwirkung verfolgt. Der Farbstoff dringt gewöhnlich langsam vor, färbt den Rand des Präparates grünlich, die Protoplasten werden fast schwarz.

[1]) P. Terletzki, Anat. d. Vegetationsorg. v. Struthiopteris germ. u. Pteris aq., Jahrb. f. wiss. Bot., 1884, XV, S. 452.

[2]) F. Kienitz-Gerloff, Die Protoplasmaverb. zwischen benachb. Gewebselem. i. d. Pfl., Bot. Ztg., 1891, XLIX, S. 1.

„Man läßt den Farbstoff noch 3 Minuten einwirken und taucht nun Objektträger mit Präparat und Deckglas in eine Schale mit ungefähr 400 ccm Wasser so ein, daß die nicht vom Farbstoff erreichte Partie des Schnittes nach oben gekehrt ist und auch so vom konzentrierten Farbstoff nicht erreicht wird.“ Das Präparat wird schnell abgespült und auf einem anderen Objektträger in Glyzerin untersucht (Fig. 121b und Fig. 122). Von körnigen Niederschlägen kann man den Schnitt durch Abpinseln befreien, hierzu empfiehlt Gardiner Kameelhaarpinsel. Nach völligem Austrocknen können diese Präparate direkt in Kanadabalsam eingeschlossen werden (Membran hellblau, Protoplasma und Plasmodesmen schwarzblau). Man kann auch Methylviolett 5 B (Bad. Sodafabr.), Hofmannsblau (Grübler) und Methylviolett B und 5 B (Bayer, Elberfeld), benutzen. Säureviolett 6 B (Elberfeld) wird ebenfalls empfohlen[1]).

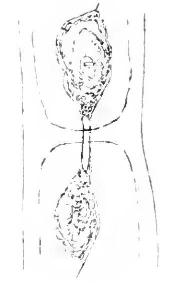


Fig. 122. Pelargonium spec. (Stielzellen einer Drüse), Behandlung mit A. Meyers Pyoktanin (Tunmann).

Die im Vorstehenden beschriebene Methode wurde von Gardiner[2]) etwas abgeändert. Bei zarten Geweben erfolgt Tötung und Fixierung mit einer Lösung von 0.1—0.2 % J und 0.15—0.25 % KJ, bei stärkeren Geweben mit einer Lös. von 0.5 % J und 0.75 % KJ. Zur Quellung dient bei zarten Objekten (Chara, Mnium undul.) 1—5 % Schwefels., bei Aucuba japonica 30 % Schwefels. Darauf folgt Beizung mit Jodschwefels. (0.5—0.75 % J u. 1.0—1.25 % KJ in 5 % Schwefels.). Nach Abspülung mit einer Jodschwefels., die 5 % Schwefels., 0.1 % J u. 0.15 % KJ enthält, wird gefärbt. Zur Färbung (10 Minuten) wird ein Gemisch gleicher Vol. von 10 % Schwefels. und von 1 % oder 5 % Pyoktanin oder Gentianaviolett benutzt. Durch Nachbehandlung mit Jodschwefels. kann die Färbung verstärkt werden. Die gefärbten Schnitte lassen sich in einem erwärmten Gemisch von 30 ccm Glyzerin, 60 ccm Wasser, 10 ccm 20 %ige Zinkchloridlös. und 1 bis 2 Jodsplitterchen fixieren und können in Glyzeringelatine eingeschlossen werden. — Gewebe, die nicht zu quellen brauchen, werden mit dem Kolossowschen Gemisch (½ % Osmiums. u. 2—3 % Urannitratlös.) fixiert.

Strasburger (S. 522, 3) bringt die aus lebendem Material hergestellten Schnitte sofort[3]) auf 5—7 Minuten in eine 1 % Osmium-

[1]) Th. Wulff, Plasmodesmenstudien, Österr. bot. Ztschr., 1906, LVI, S. 1.

[2]) W. Gardiner, Methods for the demonstr. of „connecting threads“ in the cell wall, Proc. Cambridge Phil. Soc., 1898, IX, S. 504 u.: Histol. of cell wall with spec. refer. to the mode of connec. of cells, Proc. R. Soc. London, 1898, LXII, S. 102.

[3]) Wenn die Abtötung der Protoplasten nicht genügend schnell erfolgt, dann reißt oft der sich kontrahierende Protoplast von den Plasmodesmen ab: letztere bleiben in den Membranen nachweisbar.

säure, spült mit Wasser ab, überträgt auf 20—30 Minuten in Russowsche Jodjodkaliumlösung (S. 526 ob.) und läßt die Schnitte dann in 25% Schwefelsäure 1/2 Stunde bis einen Tag lang quellen. Schließlich wird innerhalb 5 Minuten gefärbt mit „25%, mit Jod und einem Tropfen Meyerscher Pyoktaninlösung in Wasser, im Verhältnis 1 : 30, versetzter Schwefelsäure". Empfehlenswert ist auch 2stündige Fixierung mit Pikrinschwefelsäure (nach Němec[1]): 100 Teile kalt gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung, 0.5 Eisessig, 0.5 Schwefelsäure), Quellung in 25% Schwefelsäure und Färbung mit Pyoktanin.

Das Verfahren von Schaarschmidt scheint nicht nachgeprüft zu sein. Die Schnitte des mit Alkohol gehärteten Materials werden unter Deckglas mit wenig Schwefels. (1 + 2 T. Wasser) versetzt (mikroskopische Kontrolle!). Nach gutem Auswaschen mit Wasser wird mit Ammoniak neutralisiert und mit wäss. Eosin- oder mit alkohol. Safraninlös. unter Deckglas gefärbt. Bei Eosinfärbungen sollen die Membranen ungefärbt bleiben[2]. Eosin wurde auch von Macfarlane[3] benutzt (1—2 std. Einwirkung von 25% Schwefels., Auswaschen in Wasser, 1 std. Einwirkung von konz. wäss. Eosinlös. und schnelles Nachwaschen). Durch 2% Eisessig läßt sich die Färbung fixieren. Wenig in Aufnahme gekommen sind die Methoden, welche die Färbungen nachträglich differenzieren. A. Meyer erprobte Hämatoxylin. Die mit Alkohol oder mit Osmiums. gehärteten Schnitte gelangen auf 1 Tag in Hämatoxylin (Delafield), werden einige Minuten in Salzs.-Alkohol (0.5 Salzs., 100 Alkohol 60%) gebracht, nachher in Ammoniak-Alkohol (10 Tropfen offiz. Ammoniak, 100.0 Alkohol 60%) ausgewaschen; schließlich folgt nacheinander absol. Alkohol, Xylol, Kanadabalsam. Die Membran soll zuweilen farblos bleiben, doch sind die Plasmodesmen oft nicht gleichmäßig gefärbt.

Liegt nur mit Formalin (2%) fixiertes Material vor, dann versagen nach Bálint[4] die bekannten Methoden; er wäscht daher mit 90%, dann mit 70% Alkohol gut aus, färbt mit Säurefuchsin (20 g Säurefuchsin, 3 ccm Anilinöl, 200 ccm dest. Wasser). Dann folgt Auswaschen (15 Minuten) mit Pikrinsäure (1 T. gesättigte Lösung in 96% Alkohol + 2 T. Wasser verdünnt), schließlich Passage mit 96% Alkohol, Benzol-Alkohol, Benzol (jede Flüssigkeit mit wenig Pikrinsäure versetzt) und Einschließen in Benzolbalsam.

Es war bereits betont, daß der Nachweis der Plasmodesmen bei dünnwandigen Membranen nicht leicht ist. So gibt Kny (Lit. S. 440, 6)

[1]) B. Němec, Über die karyokinetische Kernteilung in der Wurzelspitze von Allium Cepa, Jahrb. f. wiss. Bot., 1899, XXXIII, S. 314.

[2]) J. Schaarschmidt, Kommunikat. v. Protoplast. u. d. Vorkomm. interzellul. Protoplasmas, Ztschr. wiss. Mikr., 1884, I, 301. Mit Eosin färben sich nur die Membranen der Bastfasern von Carica Papaya.

[3]) J. M. Macfarlane, Contr. to the history of Dionaea muscipula, Contr. of. Bot. Labor. of Pennsylvania, 1892, I, S. 7.

[4]) S. Bálint, Bot. mikrot. Not., Ztschr. wiss. Mikr., 1910, XXVII, 243.

an, daß er mit den üblichen Methoden keine brauchbaren Resultate erhalten habe, wohl aber zum Ziele gelangt sei bei Benutzung einer mehrere Jahre alten Chlorzinkjodlösung mit Hilfe des Verfahrens von Michniewicz (Öst. bot. Ztschr., 1904, LIV, Nr. 5). Nach diesem werden größere Stücke mit glatter Schnittfläche 5 Minuten in absolutem Alkohol gekocht. Parallel zur Schnittfläche hergestellte Präparate werden in Chlorzinkjodlösung gelegt und untersucht.

Bei den Pilzen wurden die Plasmaverbindungen von Chmielewsky (Justs Jahrb., 1888, S. 299) nachgewiesen nach Fixierung mit Pikrinsäure durch Hämatoxylin-Ammoniak. W. Wahrlich (Anat. d. Zelle b. Pilz. u. Alg., Petersburg, 1892) benutzte Jodjodkalium zum Färben und Chlorzinkjod zum Quellen. Die Chlorzinkjod-Wirkung wurde, wenn nötig, durch Erhitzen der Präparate bis zum Auftreten der ersten Bläschen verstärkt. A. Meyer[1]) erzielte bei Volvocineen gute Erfolge mit der Pyoktanin-Methode und bediente sich der Plasmolyse (15% Salpeter oder Sirup-Wasser, 1 + 1). Mit den Plasmodesmen der Rot- und Braunalgen beschäftigten sich Hick, Schmitz u. a., besonders Wille[2]), der sie für sämtliche Zellen der Algen angibt. Cyanophyceen untersuchte Borzi (Le communic. intracell. d. Nostochineae, Malpig., 1886).

Chemotaxis und Chemotropismus.

Eine Anzahl chemischer Substanzen bewirken Reizbewegungen, die bei freibeweglichen Organismen als Chemotaxis, bei nicht freibeweglichen als Chemotropismus zusammengefaßt werden. Die Reizbewegung ist entweder positiv (Anlockung) oder negativ (Abstoßung). Die **Chemotaxis** spielt im Leben eine wichtige Rolle (bei Befruchtungsvorgängen u. a.). Es war schon lange bekannt (Ehrenberg, Cohn)[3]), daß auf frei bewegliche Organismen chemische Stoffe einen räumlich orientierenden Reiz auszuüben imstande sind, doch erst die „Bakterienmethode" Engelmanns (S. 64) lenkte die allgemeine Aufmerksamkeit auf diese Tatsachen. Grundlegend wurden die Untersuchungen Pfeffers[4]) und die von ihm eingeführte Kapillarmethode. Einseitig zugeschmolzene Glaskapillaren von etwa 1—1,5 cm Länge, deren lichte Weite von der Größe der zu untersuchenden Organismen

[1]) A. Meyer, Plasmaverbind. u. d. Fusionen d. Pilze d. Florideenreihe, Bot. Ztg., 1902, LX, S. 139.

[2]) N. Wille, Beitr. z. Entwicklungsgesch. d. phys. Gewebesystems b. einig. Florideen, Nova Acta, 1887, LII, S. 61.

[3]) Ehrenberg, Die Infusionstiere als vollkommene Organismen, 1838, S. 80 u.: F. Cohn, Unters. üb. Bakterien, Beitr. z. Biol. d. Pfl., 1872, I, S. 142.

[4]) W. Pfeffer, Lokomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize, Unters. Bot. Inst. Tübingen, 1884, I, S. 367 u.: Über chemotaktische Bewegungen von Bakterien, Flagellaten und Volvocineen, ib. 1888, II, S. 648.

abhängt[1]), werden unter der Luftpumpe mit der Lösung der zu prüfenden Substanz auf eine bestimmte Strecke hin derart injiziert, daß am zugeschmolzenen Ende noch ein lufterfüllter Raum übrig bleibt. Dieser Raum versorgt die Kapillarlösung mit Sauerstoff und ist besonders bei sauerstoffempfindlichen Organismen von Bedeutung. Beim Füllen der Kapillaren durch Erwärmung würde nicht nur der Sauerstoff verloren gehen, sondern es wären auch Konzentrationsänderungen nicht ausgeschlossen. Die Flüssigkeitssäule in der Kapillare muß mindestens eine Länge von 2 mm haben, wenn man mit Deckglas arbeitet (Lidforss). Die zu prüfenden Organismen kommen auf dem Objektträger in einen Tropfen destillierten Wassers (chemisch rein, frei von Kupfer), dann wird die gefüllte Kapillare hineingebracht (ev. mit dem Deckglase bedeckt) und beobachtet. Handelt es sich um vergleichende Bestimmungen von Schwellenwerten, dann müssen die Organismen möglichst gleichmäßig in der Lösung verteilt sein.

Die zu prüfenden Lösungen werden tunlichst molekular mit destilliertem Wasser hergestellt (ein Gramm-Molekül im Liter) und dann planmäßig verdünnt. Ist das Molekulargewicht der Substanz nicht bekannt, dann bereitet man kaltgesättigte Lösungen. Den Prozentgehalt dieser Stammlösung bestimmt man durch den Verdunstungsrückstand. Man hat darauf zu achten, daß außer dem Reiz, dessen Wirkung ermittelt werden soll, kein weiterer Reiz in Reaktion tritt. Schon Pfeffer hat auf verschiedene Ursachen mechanischer und physiologischer Natur hingewiesen, welche Fehlerquellen bedingen können. Auch Differenzen im Sauerstoffgehalt erzeugen bei sauerstoffempfindlichen Organismen Aerotaxis, die von der festzustellenden Chemotaxis dann nicht zu unterscheiden ist. Man muß in solchen Fällen mit unbedeckten Präparaten arbeiten und die Versuchsdauer auf wenige Minuten beschränken. Konzentrationsdifferenzen, die durch Verdunstung im Kulturtropfen entstehen, können ebenfalls Chemotaxis hervorrufen. Nach Müller[2]) gilt dies „besonders für die Bestimmungen der Reizunterschiedsschwellen, wo die Außenflüssigkeit den chemotaktisch wirksamen Stoff enthält. Deshalb darf die Versuchsdauer 1 bis 2 Minuten nicht überschreiten". Durch Verdunstung wird die Konzentration des Außenmediums erhöht, es tritt gleichfalls eine Verschiebung der Reizunterschiedsschwelle ein. Das Arbeiten ohne Deck-

[1]) Bei Chytridiaceen-Zoosporen werden Kapillaren mit 67—96 μ, bei Schwärmsporen der Saprolegniaceen mit 105—134 μ, bei Isoetes mit 50—100 μ, bei Bakterien mit 60 μ, bei Marchantia mit 50—150 μ lichtem Durchmesser benutzt.

[2]) F. Müller, Unters. üb. d. chemotakt. Reizbarkeit der Zoosporen v. Chytridiaceen und Saprolegniaceen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1911, XLIX, S. 421.

glas empfiehlt sich bei Objekten mit schwachen Bewegungen, denn durch das wiederholte Anstoßen der Schwärmer an das Deckglas wird die Bewegungsenergie schnell geschwächt.

Die gleiche Substanz kann je nach der Konzentration der Lösung attraktiv und repulsiv wirken. Bei einer gewissen Konzentration schlägt die positive Reaktion (Anlockung) in die negative (Abstoßung) um. Diese kritische Konzentration ist bei den verschiedenen Organismen keineswegs die gleiche. Für die chemotaktischen Reizvorgänge gilt das Webersche Gesetz. Wenn sich die Organismen in der Lösung eines Reizmittels befinden, so kann die Anlockung nur durch ein Vielfaches der Konzentration dieses Reizmittels erfolgen. Als Unterschiedsschwelle wird dann das Verhältnis der Konzentration der Lösung bezeichnet, bei der eben noch eine Wirkung wahrnehmbar ist. Diese grundlegenden Gesetze wurden schon von Pfeffer und Stahl[1]) ermittelt.

Seit den Untersuchungen von Voegler[2]), der auch den Einfluß äußerer Faktoren auf die chemotaktische Reizempfindlichkeit studierte, gehen alle Arbeiten auf Ermittelung der Jonenwirkung ein. Nach Shibata sind bei den Samenfäden der Pteridophyten 3 Kategorien chemotaktischer Sensibilitäten zu unterscheiden: 1. die Sensibilitäten der Apfelsäure und der verwandten chemotaktisch wirksamen Dikarbonsäuren; 2. diejenige für OH-Jonen (nur bei Isoetes); 3. diejenigen für die Kationen (Metall- und H-Jonen) und Alkaloide. Die chemotaktischen Sensibilitäten der 3 Kategorien sind voneinander gänzlich unabhängig, wie der Mangel der gegenseitigen Beeinflussung zeigt.

Erwähnt seien noch die Befunde von Rothert[3]), der auch den prinzipiellen Verschiedenheiten der von Massart[4]) entdeckten Osmotaxis gegenüber der Chemotaxis nachgeht. Bei verschiedenen Organismen läßt sich die chemotaktische Empfindlichkeit durch Anästhetika aufheben, ohne daß ihre Beweglichkeit beeinflußt wird. Bei den Zoosporen von Rhizophidium pollinis wird die Empfindlichkeit durch Alkohol und Äther aufgehoben, nicht durch Chloroform; bei den Zoosporen von Rh. sphaerotheca wird schon durch 0.003 Mol. Chloroform und durch 0.042 Mol. Äther völlige Aufhebung erzielt. Chloroform und Äther gelangen in, am besten frisch bereiteten Lösungen

[1]) E. Stahl, Z. Biol. d. Myxomyc., Bot. Ztg., 1884, XLII, S. 103.

[2]) C. Voegler, Beiträge zur Kenntnis der Reizerscheinungen, Bot. Ztg., 1891, XLIX, S. 641.

[3]) W. Rothert, Beobachtungen und Betrachtungen über taktische Reizerscheinungen, Flora 1901, LXXXVIII, S. 371.

[4]) J. Massart, La sensibilité à la concentration chez les êtres unicellulaires marins, Bull. de l'Ac. Belg., 1891, XXII, S. 152.

(mit Leitungswasser) zur Anwendung (100 g Wasser bei 17° + 6.7 g Äther oder bei 20° + 0.72 g Chloroform). Diese Lösungen werden entsprechend verdünnt. Dann muß mit der großen Flüchtigkeit der Anästhetika gerechnet werden. Rothert [1]) benutzt daher kleine kalibrierte Zylindergläschen mit flachem Boden (5 cm lang, 5 mm Durchmesser) mit passenden Korkstopfen. Erst wird die Flüssigkeit mit den Organismen bis zur Höhe von 2 cm eingefüllt (mit Kapillarpipette), dann ebensoviel der Narkotikumlösung von der doppelten der gewünschten Stärke und sofort verkorkt. Der Inhalt wird gemischt, die Gläschen werden liegend aufbewahrt. Von dieser Mischung wird ein Tropfen auf den Objektträger gebracht, das Deckglas (durch Deckglassplitterchen gestützt) aufgelegt, die beschickte Kapillare eingeschoben und die zentralen Teile des Präparates geprüft. „Außer Narkotika wirken Elektrolyte schon in schwacher Konzentration stark abstumpfend, die Nichtelektrolyte dagegen erst in höherer Konzentration" (Müller).

Zuweilen bietet die Beschaffung der zu prüfenden Organismen in genügend reinem Zustande und frei von störenden Reizstoffen Schwierigkeiten. Stange [2]) und Müller arbeiteten nur mit Spezies-Reinkulturen. Ersterer züchtete Saprolegnia auf Fliegenbeinen und übertrug diese mit in den Versuchstropfen. Dabei sind Fehlerquellen durch, aus den Fliegenbeinen herausdiffundierende, chemotaktisch wirksame Stoffe (Phosphate, Eiweiß) nicht ausgeschlossen. Müller brachte die infizierten Hyphen seiner Spezieskulturen (darüber Origin., S. 429) mittels der Pinzette auf dem Objektträger in einen Tropfen Wasser, bewahrte diesen mehrere Stunden unter der feuchten Glasglocke bis zur Sporangienentleerung auf und prüfte die entlassenen Zoosporen sofort. Für ein Präparat genügen 3—4 große Pseudolpidium-Sporangien, von denen jedes viele Hundert Zoosporen erzeugt. — Auch die Entleerung der Spermatozoiden kann Schwierigkeiten bereiten. Fujii fand, daß die Mikroprothallien von Isoetes unter Reizwirkung gewisser Bestandteile des Leuchtgases sofort ihre Spermatozoiden entlassen. Daher hielt Shibata [3]) den auf dem Objektträger befindlichen Tropfen Wassers zunächst einige Sekunden über die Mündung eines Kölbchens, das mit Leuchtgas gesättigtes Wasser enthielt. Dann erst werden die Isoetes-Mikrosporen eingetragen, die nun die Spermatozoiden entlassen, nun wird die Kapillare eingelegt, mit dem Deckglas bedeckt und beobachtet.

Anschließend einige Literaturbelege, ohne Vollständigkeit anstreben zu wollen. Die Plasmodien der Myxomyceten werden durch

[1]) W. Rothert, Über die Wirkung des Äthers und Chloroforms auf die Reizbewegungen der Mikroorganismen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1904, XXXIX, S. 1, und: E. Overton, Studien über die Narkose, Jena 1905.

[2]) B. Stange, Chemotakt. Reizbew., Bot. Ztg., 1890, XLVIII, S. 107.

[3]) K. Fujii, Bot. Mag. Tokyo, XXIV, S. 75. — K. Shibata, Untersuchungen über die Chemotaxis der Pteridophyten-Spermatozoiden, Jahrb. f. wiss. Bot., 1911, XLIX, S. 1.

Loheextrakt (Milchsäure) angelockt, fliehen aber Chlornatrium, Glyzerin, Zucker, Salpeter, Kaliumkarbonat (Stahl). Auf Spermatozoiden der Laubmoose wirken (0.001%) Apfel- und Maleinsäure und ihre Salze positiv. Die Samenfäden von Isoetes, Salvinia und Equisetum werden außer von Apfelsäure auch von neutralen Salzen der Bernstein-, Fumar- und Weinsäure angelockt. Alkaloidsalze wirken in verschiedenem Grade positiv, ebenso freie Alkaloide, wenn sie in genügendem Maße wasserlöslich sind (Colchicin) (Shibata[1]). Schwächer wirken einige Farbstoffe (Aurantia, Auramin, Methylviolett, Fuchsin). Für die Spermatozoiden von Lycopodium, die sich Apfelsäure gegenüber ebenso wie die Samenfäden von Marsilia vollkommen indifferent verhalten, ist Zitronensäure das spezifische Chemotaktikum (Bruchmann[2]): nach Stange werden die Myxamöben von Chondrioderma difforme und Fuligo varians von Apfel-, Milch- und Buttersäure, Lohedekokt, Asparagin chemotaktisch gereizt, während auf die Zoosporen von Saprolegnia freie Phosphorsäure und Salze dieser stark chemotaktisch wirken. Buller[3]) zeigte, daß auf die Farnsamenfäden (Gymnogramme Martensii) außer Wein-, Essig-, Ameisen-, Apfel- und Oxalsäure noch Kaliumsalze und Phosphate in relativ hohen Konzentrationen eine mäßig anlockende Wirkung ausüben. Auch die Metallionen von Kalium- und Rubidiumsalzen wirken positiv.

Lidforss[4]) fand, daß die Spermatozoiden der Marchantiaceen durch Proteinstoffe positiv gereizt werden. Erfolge gaben Albumine, Globuline, Nukleoalbumine, Proteide (Hämoglobin, Nuklein), ferner Fermente (Diastase, Ptyalin). Negativ wirkten Tabakdiastase und Alkalialbuminat (jedenfalls infolge schädlicher Beimengungen). Sie werden ferner von Kaliumsalzen (Reizschwelle bei $^{1}/_{1000}$ mol.), Rubidium- und Caesiumsalzen prochemotaktisch gereizt. Åkerman[5]) hat Versuche darüber angestellt, ob die Empfindlichkeit für Proteinstoffe durch Kaliumsalze beeinflußt wird. Dies ist nicht der Fall, denn

---

[1]) K. Shibata, Stud. üb. d. Chemotaxis d. Isoetes-Spermatoz., Jahrb. wiss. Bot., 1905, XLI, S. 561 u.: Üb. d. Chemotaxis der Spermatoz. v. Equisetum, Bot. Magazine, 1905, XIX, S. 79 u.: Stud. üb. d. Chemotaxis d. Salvinia-Sperm., Bot. Mag. Tokyo, 1905, XIX, S. 39.

[2]) H. Bruchmann, Von der Chemotaxis der Lycopodium-Spermatozoiden, Flora 1909, XCIX, S. 193.

[3]) R. Buller, Contributions to our knowledge of the physiology of the spermatozoa of farns, Ann. of Bot., 1900, XIV, S. 543.

[4]) Bengt Lidforss, Über die Reizbewegungen der Marchantiaceen-Spermatozoiden, Jahrb. f. wiss. Bot., 1905, XLI, S. 65.

[5]) Å. Åkerman, Über die Chemotaxis der Marchantia-Spermatozoiden, Zeitschr. f. Bot., 1910, II, S. 94.

wenn die Außenflüssigkeit 0.1% Kaliumnitrat, die Kapillarflüssigkeit aber 0.1% Kaliumnitrat und 0.01% Hämoglobin enthält, erfolgt eine normale Ansammlung in der Kapillare. Natrium- und Kalziumsalze üben keine chemotaktische Reizwirkung aus, Magnesium- und Ammoniumsalze rufen schwache, Salze der Schwermetalle starke Repulsionserscheinungen hervor.

Bei Zoosporen von Rhizophidium pollinis bewirken genuine Proteinkörper und Fermente Reizbewegungen, bei Schwärmsporen von Rh. sphaerotheca, Pseudolpidium und Saprolegnia mixta außerdem Proteinspaltlinge und bei Saprolegnia-Zoosporen noch Phosphat-Jonen (Müller). Die Schwärmsporen von Chytridium zygnematis werden durch die beim Absterben der Zygnema-Zellen entstehenden Zerfallsprodukte chemotaktisch gereizt (Rosen)[1]. — Einige Spaltpilze und Flagellaten werden durch gewisse Metallsalze angelockt (Pfeffer). Chromatium Weissii wird durch verd. Lösungen von Schwefelwasserstoff, Ammonium- und Kaliumnitrat und Ammonphosphat angelockt, durch konz. Lösungen dieser Stoffe abgestoßen (Miyoshi, Lit. S. 69, 1). Bei Spirillum rubrum und Bazillus „z" (aus Erbsendekokt) wirken Ammonium-chlorid, -nitrat, Asparagin, Fleischextrakt, Diammoniumphosphat, Dinatrium- und Dikaliumphosphat positiv. Die letzteren beiden aber nur bei Gegenwart von Säure-Jonen[2]. —

In sehr lebhafter Bewegung befindliche Organismen kann man zur mikroskopischen Beobachtung im Gesichtsfelde behalten, wenn man auf den Tropfen ein Stückchen Musselin legt und dann erst mit dem Deckglase bedeckt. Die Bewegungen lassen sich auch verlangsamen durch Zusatz einer Lösung von Gummiarabikum (Behrens, Ztschr. wiss. Mikr., 1892, IX, 484) oder von 0.8—1% Gelatine (Jensen, Biol. Centrbl., 1892, XII, 556).

Chemotropismus: Pollenschläuche werden in ihrer Wachstumsrichtung durch Chemotropismus beeinflußt. Zum Studium desselben sind keimende Pollenkörner (völlig reifer Pollen) erforderlich[3]. Die

[1] F. Rosen, Beitrag zur Kenntnis der Chytridiaceen, 1886, S. 12.

[2] H. Kniep, Chem. v. Bakt., Jahrb. wiss. Bot., 1906, XLIII, S. 215.

[3] Nach J. Simon läßt sich Pollen längere Zeit aufbewahren, ohne seine Keimkraft zu verlieren. Der den Antheren entnommene Pollen kommt in kleine mit Watte verschlossene Gläschen, welche in ein größeres Glasgefäß gestellt werden, das luftdicht verschließbar ist und auf dessem Boden unter einer Watteschicht sich wasserfreies Chlorkalzium befindet. (Eine neue Methode zur Aufbewahrung von Blütenstaub in befruchtungsfähigem Zustand, Möllers deutsch. Gärtn. Ztg., 1910, XXV, S. 11). Hierauf machte schon vorher Pfundt aufmerksam, der zeigte, daß die Lebensdauer des Pollens vom Feuchtigkeitsgehalt der Luft abhängt. Pollen der Herbst- und Frühjahrsblüher zeigen (den Witterungsverhält-

Pollenkörner einiger Pflanzen (Nicotiana, Lobelia) keimen bereits in Wasser, falls der nötige Sauerstoff zugegen ist. Man kultiviert den Pollen in einem auf dem Objektträger flach ausgebreiteten Tropfen Wasser, bringt den unbedeckten Objektträger in einen dampfgesättigten Raum und stellt von Zeit zu Zeit die Wirkung fest (Lidforss)[1]. Überwiegend treibt der Pollen erst in Zucker-Gelatine-Lösung Schläuche. Diese Lösung enthält auf 100.0 Brunnenwasser 1.5% Gelatine und 3—30% Rohrzucker. Die erforderliche Zuckermenge ist für die Pollenkörner verschiedener Pflanzen verschieden. Lathyrus-Arten keimen in Gelatinelösungen mit 15, Ampelopsis hederacea mit 20—30, Päonien mit 1—20, Papaver mit 1, Narcissus, Tulipa und Leucojum mit 2—5% Rohrzucker. Pfundt[2]) teilt Minima, Maxima, Optima der Rohrzuckerlösungen für die Keimung von über 100 Pollenarten mit. Frisch geernteter Pollen bildet sowohl in verd. als auch in konz. Lösung Keimschläuche, kurz vor dem Absterben aber nur in günstigen Konzentrationen. Ein anderes gutes Substrat, vornehmlich um längere Schläuche zu erzielen, ist Agar. Die Konzentration hängt nach Jost[3]) von der Beschaffenheit des Agar-Agar ab. Bei einem schwer löslichen, unreinen Agar sind 0.25—0.50%, bei einem leicht löslichen, reinen Agar 1% Lösungen zu verwenden. Gute Dienste leistet eine Lösung mit 1% Zucker und 1% leicht löslichem Agar. Hierbei kommt dem Agar die Rolle eines Nährstoffes nicht zu. Förderung des Wachstums wird in einzelnen Fällen durch Zitronensäure bewirkt. Nach Molisch[4]) erfolgt die beste Schlauchbildung bei Rhododendron sp. (12 mm lange Schläuche) auf Agar 1%, Zucker 5%, Zitronensäure 0.01%, nach Jost bei Lilium martagon auf 1% Agar, 1% Zucker und 0.01% Zitronensäure und bei einer Leguminose wirkt 0.002% Zitronensäure wachstumfördernd. Lopriore[5]) kultiviert Pollen von Araucaria in Birnenabkochung in dunklem Raum bei 25—30°. Pollen von Grami-

---

nissen angepaßt) nur geringe Empfindlichkeit gegen Luftfeuchtigkeit. Bei einigen Anemophilen keimt nur der spontan ausgestäubte Pollen, nicht aber der den geschlossenen Antheren entnommene (Elfing, Stud. üb. d. Pollenk. d. Angiospermen, Jen. Ztschr. f. Naturw., 1879, S. 1).

[1]) B. Lidforss, Biol. d. Poll., Jahrb. wiss. Bot., 1896, XXIX, S. 1.

[2]) M. Pfundt, Einfluß d. Luftfeuchtigkeit auf d. Lebensdauer d. Blütenstaubes, Jahrb. wiss. Bot., 1910, XLVII, S. 1.

[3]) L. Jost, Selbststerilität einiger Blüten, Bot. Ztg., 1907, LXV, S. 77 u.: Phys. d. Pollens, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 504.

[4]) H. Molisch, Zur Physiologie des Pollens, Sitzb. Wien. Akad., 1893, CII_1, S. 423.

[5]) G. Lopriore, Vielkernigkeit der Pollenkörner u. Pollenschläuche, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 335.

neen, Corydalis cava u. a., die empfindlich gegen Flüssigkeiten sind, werden auf Pergamentpapier ausgesäet und in die feuchte Kammer gebracht (Jost). Es ist bisher in Kultur nur gelungen kurze Schläuche zu erzielen, niemals so lange, wie sie, selbst bei sehr kurzen Griffeln, zur Befruchtung nötig sind.

An wachsenden Pollenschläuchen läßt sich nun der Chemotropismus studieren. Pollenschläuche der Digitalis-Arten, von Epilobium angustif., hirsutum, Oenothera biennis, glauca, grandiflora, Primula chinensis werden durch Trauben-, Rohr-, Frucht-, Milchzucker. 2% Dextrin[1]) (Saccharochemotropismus), durch Narbenstücke der betreffenden Pflanze[2]), selbst durch vegetative Teile anderer Pflanzen (Querschnitte von Allium-Wurzel) angelockt[3]). In letzteren wirken die Proteine (es wirken nämlich: Diastase [frei von anorganischen Salzen], Albumin aus Eigelb. Konglutin und Globulin aus Pferdeblut, Kasein, Parakasein, Vitellin aus Eigelb, Alkalialbuminat u. a.[4]), Protochemotropismus). Pflanzenstücke werden dem Kulturtropfen mit wachsenden Pollenschläuchen aufgelegt, der Objektträger wird an einen dunklen und feuchten Ort gebracht. Die anderen Reagentien wurden früher mit einer Kapillare dem Kulturtropfen zugeführt; jetzt bringt man (bei Gelatinekulturen) von den Proteinen, die sich sehr langsam lösen, ein kleines Körnchen auf die erstarrende Pollenkultur. Für Zuckerarten wird in der Kultur eine Vertiefung angebracht. Man bringt auf den mit Pollen beschickten Kulturtropfen eine Glasperle, die nach einiger Zeit vorsichtig abgehoben wird. Die Vertiefung des erstarrten Tropfens wird mit der betr. Zuckerlösung angefüllt. Man kann die, durch den zentrifugal diffundierenden Zucker bewirkten, chemotropischen Krümmungen mikroskopisch verfolgen.

Bei Pilzhyphen wurde Chemotropismus 1873 von Pfeffer vermutet. J. Wortmann (Bot. Ztg., 1887, XLV, 812) und A. Fischer (Jahrb. wiss. Bot., 1882, XIII, 304) stellten bei jungen Schläuchen von Saprolegnia Krümmungen nach geeigneten Nährstoffen (Fliegenbeinen, Insektenlarven) fest. M. Büsgen (Bot. Ztg., 1893, LI, 53) führte das Eindringen der Hyphen in die Nährpflanze auf chemische Reize zurück. Grundlegend wurden die Arbeiten von Pfeffer u. Miyoshi[5]).

[1]) M. Miyoshi, Chemotr. d. Pilze, Bot. Ztg., 1894, LII, S. 1 u.: Reizbew. d. Pollenschläuche, Flora 1894, LXXVIII, S. 76.

[2]) H. Molisch, Ursachen der Wachstumsricht. b. Pollenschläuchen, Sitzb. Wien. Akad., 17. I. 1889.

[3]) B. Lidforss, Chemotropismus der Pollenschläuche, Ber. deutsch. bot. Ges., 1899, XVII, 236 u.: Reizbew. d. Pollenschläuche, Ztschr. f. Bot., 1909, I, 443.

[4]) Die Spaltlinge der Eiweißkörper sind wirkungslos.

[5]) W. Pfeffer, Abh. Kgl. Sächs. Ak., 1893 u.: M. Miyoshi, Chemotr. d. Pilze, Bot. Ztg., 1894, LII, 1 u.: Durchbohrung v. Membranen d. Pilzhyphen,

Miyoshi injizierte Tradescantia-Blätter mit 4% Rohrzuckerlösung, säte die Pollenkörner von Digitalis purpurea mit einem Pinsel gleichmäßig auf die spaltenführende Blattunterseite und brachte die Blätter auf 12 bis 20 Stunden in einen feuchten dunklen Raum. Die Pollenschläuche sind dann stark nach den Spaltöffnungen abgelenkt und wachsen, meist zu mehreren, durch die Spalten ins Blattgewebe hinein. Es lassen sich zu diesem Versuche auch durchlochte Kollodiumhäute benutzen (s. unt.).

Benutzt werden frisch geerntete Sporen aus Reinkulturen von Mucor-Arten, Phycomyces, Penicillium, Aspergillus (unter Glasglocke auf sterilisiertem. mit 2% Rohrzuckerlös. getränktem Schwarzbrot gezogen), Saprolegnia u. a. Als Membranstücke dienen dünne Glimmerplättchen (10:15 mm), Kollodiumhäute (Kollodium mit etwas Mandelöl versetzt, zur Erzielung geschmeidiger Häute), die mit einer sehr feinen Nadel durchstochen werden und die abgezogene spaltenführende Oberhaut der Zwiebelblätter von Allium cepa, sowie lebende Blattstücke (Tradescantia discolor, procumbens): letztere werden mit der betr. Lösung unter der Luftpumpe injiziert, bis sie durchscheinend werden, mit Wasser abgespült und mit Fließpapier abgetrocknet. Die Membranstücke gelangen auf eine mit dem Reizstoff versehene Gelatinemasse, auf ihrer Oberseite werden mit einem feinen Pinsel die Sporen ausgesät. Man kann auch die Sporen in Gelatine suspendieren und die sporenführende Gelatinemasse der Oberseite der Häute (der spaltenführenden Blattseite) auftragen. Die Keimung erfolgt in einem dampfgesättigten Raum (Belichtung ist ohne Einfluß). Der Reizstoff diffundiert langsam[1]) durch die künstlichen oder natürlichen Spalten und wirkt auf die wachsenden Schläuche. Chemotropismus erfolgt nach 14—24 Std., bei Saprolegnia nach 6—13 Std. Positiv wirken 2% Rohr- und Traubenzucker, Dextrin, Pflaumendekokt, 2% Fleischextrakt (infolge seines Phosphatgehaltes), Lezithin, Pepton, Ammonphosphat. Negativ wirken alle freien anorganischen und organischen Säuren, Alkalien, Alkohol, einige Salze (weinsaures Kalium-Natrium, Kalisalpeter, Kaliumchlorat. Magnesiumsulfat). Einige Stoffe (1—2% Glyzerin oder Gummiarabikum) sind wirkungslos. Einige der besten Lockmittel haben kleine Schwellenwerte, sehr kleine Mengen (0.01% Traubenzucker und 0.05% Ammoniumnitrat für Mucor-Arten, 0.005% Fleischextrakt für Saprolegnia) bewirken bereits deutliche Reizerscheinungen. Traubenzucker wirkt bei Mucor stolonifer bereits in 0.01% Lösung deutlich, erreicht den Höhepunkt der Wirkung in 2 bis

Jahrb. f. wiss. Bot., 1895, XXVIII, 271. Die Untersuchungen von Miyoshi konnte in neuerer Zeit Fulton nicht bestätigen (Bot. Gazette, 1906, XLI, 81).

[1]) Bei zu schneller Diffusion empfinden die Hyphen keine Konzentrationsdifferenz.

5 % Lösung, bei 30 % ist die Wirkung nur noch schwach und bei 50 % negativ.

In einfacher Weise kann man Pilzsporen auf eine sterile 5 % Gelatineschicht aussäen und nach der Keimung eine kleine Menge Traubenzucker auf die Gelatineschicht bringen. Der Zucker löst sich langsam, von seiner Lagerungsstelle aus verbreitet sich ein Diffusionsstrom, nach dem sich die wachsenden Schläuche hin krümmen. Reinhardt[1]) legte der Gelatinekultur von Pezizahyphen seitlich ein Gelatinestückchen mit höherem Zuckergehalt an. Die meisten Hyphen bogen unter rechtem Winkel in die zugesetzte Gelatine ein.

Da die wachsenden Hyphen (Penicillium glaucum, Botrytis cinerea) membranlösende Enzyme ausscheiden, so kann man auch spaltenfreie Epidermen (Allium) und undurchlochte Kollodiumhäute, deren Dicke nicht 0.5 mm übersteigen darf, benutzen. Man trägt die mit dem Reizstoff versehene Nährgelatine (3 % Gelatine, 2 % Rohrzucker) in 2—3 mm hoher Schicht auf ein Deckgläschen auf, bedeckt mit dem Kollodiumhäutchen, auf dessen Oberseite in nahrstoffarmer Gelatine die Sporen ausgesät werden. Die Ausführung auf einem Deckgläschen gestattet die Betrachtung des Präparates auf beiden Seiten. Nach 2—4 Tagen haben die Hyphen die Membranen durchbohrt.

IV. Die Zellmembran.

Die pflanzlichen Zellwände bauen sich aus verschiedenen chemischen Substanzen auf, unter denen die Polysaccharide an erster Stelle stehen. Zellwände, die frei von Polysacchariden sind, treten seltener auf (Chitinmembran, Suberinlamellen). Von den Polysacchariden kommt in den Membranen nur selten ein einziger Vertreter vor. Meist treffen wir Vertreter verschiedener Gruppen gleichzeitig an. Doch bezeichnet man in der Mikrochemie eine Membran nach derjenigen Substanz, die für die mikrochemischen Reaktionen bestimmend ist. Wenn daher von „Zellulosemembranen" die Rede ist, so wird damit ausgedrückt, daß die betreffende Zellwand in erster Linie typische Zellulosereaktion gibt.

Die Membranen werden oft von anderen Stoffen durchtränkt. Die auf Wanderung begriffenen Körper (Glykosen, Fettseifen) hat man bisher noch nicht mit Sicherheit in der Membran ermittelt. Viele organische Stoffe (Gerbstoffe, Farbstoffe u. a.) werden von der Membran gespeichert. Vor der mikrochemischen Bestimmung der Membran müssen diese Körper unter Umständen entfernt werden. Von anorganischen Stoffen treffen wir vorzugsweise Kalium- und Kalziumsalze und Kieselsäure an. Der Gehalt an gespeicherten Salzen ist oft so groß, daß bei vor-

[1]) M. O. Reinhardt, Das Wachstum der Pilzhyphen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1892, XXIII, S. 528.

sichtigem Glühen der Präparate ein „Aschenskelett" zurückbleibt, das trocken unter Deckglas betrachtet, die Konturen der Zellen zeigt. Das Aschenskelett ist zum Teil in Wasser löslich und enthält neben Kalziumsalzen (S. 115) vorwiegend Kaliumverbindungen (S. 106), in bestimmten Fällen Kieselsäure (S. 100).

Alle Membranen, selbst die jugendlichen, sind infolge der Anordnung ihrer Micellen (Naegeli) doppelbrechend; wahrscheinlich bestehen Beziehungen zwischen den optischen Elastizitätsachsen und der Quellungsrichtung.

Trotz mancher Fortschritte ist die Membranchemie[1]) nicht völlig geklärt (zumal bei verschiedenen makrochemischen Untersuchungen offenbar Inhaltsstoffe mit verarbeitet worden sind), so daß hier nur eine mikrochemische Charakteristik der hauptsächlichsten Pflanzenmembranen gegeben werden kann. Einleitend soll in Kürze auf die Methoden zur Erforschung des Wachstums der Membran und ihrer feineren Struktur eingegangen werden.

An der Bildung der jugendlichen Membran scheint sich der Zellkern zu beteiligen. Die Ansichten hierüber sind noch strittig. Klebs sagt: „ohne Kern keine Membranbildung" und Haberlandt weist darauf hin, daß der Kern sich oft an der Stelle einseitiger Wandverdickung befindet. Nach Palla sollen an kernfreien Plasmastücken ebenfalls Membranbildungen auftreten, ein Befund, den Pfeffer und Townsend auf feine Plasmastränge zurückführen. Strumpf stellt die Bedeutung der Kerne bei der Membranbildung ganz in Abrede. Auffallend ist aber die Tatsache, daß bei vermehrter Zellulosebildung die Kerne sich häufig durch ihre Größe auszeichnen und amitotische Zustände zeigen (Mykorrhizen bei Orchideen, W. Magnus, Zellulosebalken im Embryosack, Tischler, Buscalioni).

Die Entwicklungsgeschichte der Zellplatte ist aufgeklärt. Die ersten Anfänge der Zellplatte bei der Zellteilung sind als äquatoriale Anschwellungen der Verbindungsfäden der Tochterkerne zu erkennen. Die Verbindungsfäden ziehen sich von den Tochterkernen auf den Äquator zurück und nehmen dort an Zahl zu. Die Elemente der Zellplatte verschmelzen bald zu einer kontinuierlichen Lamelle. Die Verschmelzung wird durch die gleiche Substanz bewirkt, aus der die Zellplattenelemente bestehen. Die einzelnen Elemente zeigen zunächst eine stäbchenförmige Anordnung. Die Entwicklung läßt sich nach Strasburger[2]) gut an mit Flemming fixierten und mit Safranin-Gentianaviolett-Orange G gefärbten Präparaten verfolgen. Die Anschwellungen werden wie die Verbindungsfäden violett, das übrige Cytoplasma braun. Bei fortschreitender Entwicklung der Zellplatte nimmt in gefärbten Schnitten die violette Farbe ab und weicht schließlich der

[1]) Eine Einteilung der pflanzlichen Membranstoffe hat Tschirch gegeben (Handb. d. Pharm., 1912, II, 224).

[2]) E. Strasburger, Die pflanzl. Zellhäute, Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXI, S. 511.

braunen Färbung des Cytoplasmas. Die auf diese Weise entstandene Hautschicht spaltet sich und in der Spaltungsfläche erscheint eine Trennungsmembran aus Zellhautstoff (Studienobjekte: Pollenmutterzellen von Lilium-Arten, von Alstroemeria chilensis. Larix europaea und Sporenmutterzellen von Psilotum triquetrum). Die Zellhautstoffe sind somit Produkte des Protoplasmas: diese „werden, um Zellhäute zu bilden, entweder auf der Oberfläche des Protoplasten ausgeschieden. oder verbleiben im Innern des Protoplasten, um dort mannigfache Ausgestaltung zu erfahren. In manchen Fällen (Massulaanlagen von Azolla) wird eine gegebene Cytoplasmamasse nachweisbar ohne sichtbaren Rest in Membranstoff verwandelt" (Strasburger).

Es ist daher naheliegend, daß man in den Zellhäuten nach Eiweißsubstanzen suchte und besonders Wiesner[1]) nahm Protoplasma in der Membran an und gab Eiweißreaktionen für meristematische und ausgewachsene Gewebe, Krabbe[2]) für Sklerenchymfasern an. Krasser[3]) suchte die Ansicht mit der Alloxanmethode (S. 417) zu stützen. Klebs, A. Fischer[4]) und Correns (Lit. S. 416, 2) verneinen einen Eiweißgehalt der Membran. Mit Millon (kalt) werden alle unverholzten Membranen der Bromeliaceen rot, nur jugendliche Wände reagieren nicht. Der reagierende Stoff ist gleichmäßig verteilt, besonders aber in der Mittellamelle. Die Reaktion tritt auch in Schnitten ein, die 6 Tage mit Glyzerin-Pepsin oder -Pankreatin (zur Lösung des Eiweiß) behandelt waren. A. Fischer, Correns und Saito nehmen Tyrosin an. Krasser hatte jedoch vor der Behandlung mit Millon die Schnitte mit Wasser ausgekocht. Der reagierende Stoff ist noch unbekannt und jedenfalls kein Eiweiß, wahrscheinlich auch kein Tyrosin. Besonders in der Mittellamelle liegen noch unbekannte (aromatische) Körper vor. Wo Schwefelsäure verholzte Wände rötet, da beginnt die Färbung in der Mittellamelle, um von dort auf die anderen Lamellen überzugehen.

Hierzu sei ein Befund von Aisslinger[5]) erwähnt, der an der Spitze der Fasern von Crotalaria juncea, Parkia africana und Pueraria

[1]) J. Wiesner, Organis. d. vegetab. Zellhaut, Sitzb. Wien. Ak., 1886, XCIII 1, Sep. u.: Nachweis der Eiweißkörper, Ber. d. bot Ges., 1888, VI, 187.

[2]) G. Krabbe, Veg. Zellmembran, Jahrb. f. wiss. Bot., 1894, XXVI, 637.

[3]) F. Krasser, Lit. S. 417 u.: Mikrochem. Nachweis von Eiweiß in d. pfl. Zellhaut, Bot. Ztg., 1888, XLVI, 209.

[4]) G. Klebs, Krit. Bem. z. Arb. von Wiesner, Biol. Centralbl., 1886, VI, 449 u.: Bem. z. Arb. v. Krasser, Bot. Ztg., 1887, XLV_2, 697. — A. Fischer, Z. Eiweißreakt. d. Zellmemb., Ber. d. bot. Ges., 1887, V, 423 u. 1888, VI, 113.

[5]) H. Aisslinger, Beitr. z. Kenntn. wenig bekannter Pflanzenfasern, Diss. Zürich 1907. S. 45.

thunbergiana fand, „daß zuweilen die Verdickungsschichten sich nicht lückenlos aufeinanderlegen, sondern freie Räume zwischen sich lassen, in denen sich zuweilen Plasma findet". Mikrochemische Einzelheiten fehlen. Weitere Prüfungen in dieser Richtung sind anzuraten. Wahrscheinlich eignet sich hierzu eine entwicklungsgeschichtliche Untersuchung der sog. Doppelhaare[1]).

Die oben erwähnten aromatischen Einlagerungen in unverholzten Membranen lassen sich durch die Diazo- und Nitritreaktion von Raciborski[2]) nachweisen, Reaktionen, die an einem großen Material systematisch erprobt werden sollten. Die Nitritreaktion ist eine Umkehrung der Diphenylamin-Schwefelsäure-Reaktion (S. 82). Die Schnitte gelangen in 10 % Natriumnitrit, dann auf höchstens 1 Min. in 10 % Schwefelsäure und schließlich in 10—20 % Natriumkarbonat. Der vorzugsweise in der Mittellamelle entstehende Farbstoff ist haltbar, in Alkohol unlöslich und läßt Anfertigung von Dauerpräparaten zu. Umständlicher ist die Diazoreaktion, weil die Herstellung einer frischen Diazolösung[3]) jedesmal erforderlich ist. Bei dieser werden die Präparate in einem Uhrgläschen in etwa 10—20 % Natriumkarbonat gebracht und einige Tropfen Diazolösung aufgetropft. Auch hierbei entsteht die Färbung sofort, ist haltbar und gut lokalisiert.

Die Anwesenheit von Plasma in der Zellwand hat Wiesners Dermatosomentheorie (Lit. S. 540, 1) zur Voraussetzung. Die Hauptmasse der Zellwand soll aus kleinen, runden organisierten Gebilden bestehen (Dermatosomen), die, so lange die Zellwand wächst, durch feine Plasmastreifen verbunden sind. Die Dermatosomen, die aus Mikrosomen des Protoplasmas (Plasomen) hervorgehen sollen, weist er mit dem „Zerstäubungsverfahren" nach. Die Objekte werden auf 24 Std. in einer 1 % Salzsäure belassen und nach Absaugen der anhaftenden Flüssigkeit auf 50—60° (kleinere Objekte auf 30—50°) erwärmt. Durch leichten Druck lassen sich dann die Membranen in ein höchst feines Pulver zerreiben. Versuchsobjekte sind: Lein-, Hanf-, Jutefasern, meristematische Gewebe, Holz (Tilia, Pinus), Parenchym (Kartoffel, Holundermark). Die Zerstäubung bei dem

[1]) H. Solereder, Deckhaare d. Pimentfr. u. d. Myrtaceen, Arch. d. Pharm., 1907, CCXLV, S. 410 u.: O. Tunmann, An. Unt. von Eugenia apiculata m. bes. Berücks. d. Sekretbeh. u. Trichome, Pharm. Zentralh., 1909, L, S. 894.

[2]) M. Raciborski, Beiträge zur botanischen Mikrochemie, Bull. de l'Acad. de Cracovie, 1906, S. 553.

[3]) Die Lösung hält sich nur wenige Stunden, Raciborski gibt folgende Vorschrift: „etwa 0.2 g p-Nitroanilin (oder Sulfanilsäure oder eine der Naphthylaminsulfosäuren) wird mit etwas größerer Menge Salzsäure versetzt. Dazu wird dann Wasser zugesetzt, mit Eisstücken gut gekühlt, und schließlich wird dazu unter fortwährendem Rühren soviel Natriumnitritlösung zugesetzt, bis die Probe auf Jodkalistärkepapier eben die blaue Jodreaktion liefert. Die Lösung soll mit Natriumkarbonat keine rote Reaktion geben".

starkwandigen Endosperm von Phytelephas gelingt erst nach monatelanger Salzsäurebehandlung, gar nicht bei Hyphen verschiedener Polyporus-Arten und beim Kork. Die Zerfallsprodukte verholzter Membran geben Ligninreaktion, die von Zellulosemembranen Zellulosereaktionen. — Diese Theorie hat wenig Zustimmung gefunden. Pfeffer (Energetik, Sächs. Ak. Abh., 1892, XVIII, 151) konnte künstliche Zellulosehäute (Kollodium) in Dermatosomen zerlegen. Die Dermatosomen hält Fischer für Zertrümmerungsprodukte, Zimmermann für die dichtesten Partien der Membranen, Correns für vorgebildet.

Die pflanzlichen Membranen wachsen durch Intussuszeption und durch Apposition. Beim Studium über das **Wachstum** der Zellwände ist es vorteilhaft die neugebildeten Membranlamellen von den älteren mit Sicherheit unterscheiden zu können. Hierbei muß naturgemäß in erster Linie dafür gesorgt werden, daß die Lebenstätigkeit der membranbildenden Zellen nicht gestört wird. Das kann auf verschiedene Weise erreicht werden.

So läßt sich Neubildung von Membranen bei jenen Pflanzen beobachten, bei denen der Plasmakörper nach erfolgter Plasmolyse durch konz. Zuckerlösung nicht zugrunde geht[1]). Das beste Versuchsobjekt ist Vaucheria[2]): hier tritt in 10 % Glykoselösung Neubildung der Zellhaut bereits innerhalb 1 Stunde ein. Weitere Objekte bilden Zygnema-, Mesocarpus-, Oedogonium-Arten. Die Blattzellen von Funaria und Helodea brauchen 8—10 Tage zur Neubildung. Gute Resultate liefern gekochte und filtrierte Lösungen von 16—20 % Rohrzucker und 10 % Glykose, in denen sich Pilze und Bakterien zu langsam entwickeln, um störend zu wirken. Zusatz von 0.01 % Kongorot[3]) zur Zuckerlösung läßt die neugebildete Wand gleich bei der Entstehung scharf hervortreten. Der Farbstoff stört nicht die Lebenstätigkeit der Zellen, fördert das Dickenwachstum und bringt das Flächenwachstum zum Stillstand.

In ähnlicher Weise wurden von Noll (Lit. S. 482,2) bei Meeresalgen Eisenfärbungen der Membran erzeugt, ohne die Lebenstätigkeit der betreffenden Algen zu schädigen. Die bei weiterer Kultur sich neubildenden Membranen sind farblos und die ursprünglich gefärbten nehmen bei weiterem Wachstum durch Intussuszeption eine hellere Färbung an. Die Algen gelangen auf einige Sek. in eine Mischung von 1 Seewasser + 2 Süßwasser, dem soviel Ferrocyankalium zugefügt

---

[1]) G. Klebs, Beitr. z. Phys. d. Pflanzenzelle, Unt. bot. Inst. Tübingen, 1888, II, 489.

[2]) Schon von E. Strasburger benutzt (Stud. üb. Protoplasma, Jen. Ztschr. f. Naturw., 1876, X, 415).

[3]) Kongorot wurde bei Chara foetida (Rhizoiden) u. Lepidium (Wurzeln) von Zacharias benutzt (Wachst. d. Zellhaut b. Wurzelhaaren, Flora, 1891, LXXIV, 467), Einwirkung 30 Min.

ist, daß das spezifische Gewicht der Mischung dem des Seewassers gleicht (1.026). Die Algen werden darauf durch reines Seewasser gezogen und kommen auf 2 Sek. in ein frisch bereitetes Gemisch von 2 Seewasser + 1 Süßwasser nebst einigen Tropfen Eisenchlorid. Das Verfahren kann zur Erzeugung stärkerer Farben einige Male wiederholt werden. Alle Membranschichten sind jetzt gleichmäßig durch Berlinerblau gefärbt. Doch verschwindet die Färbung durch Alkaliausscheidung allmählich, läßt sich aber durch Eintauchen der Algen in eine mit Salzsäure angesäuerte Lösung von Ferrocyankalium wiederum hervorrufen. — Mit Ferricyankalium und milchsaurem Eisenoxydul läßt sich Turnbulls Blau speichern.

Viele Membranen zeigen keinen homogenen Aufbau, sondern lassen bei genauer Betrachtung **Differenzierungen** mehr oder weniger ohne weiteres erkennen. Bei geschichteten Membranen heben sich die einzelnen Schichten durch ihr verschiedenes Lichtbrechungsvermögen scharf voneinander ab. Besonders klar tritt der Membranaufbau an Mikrotomschnitten hervor (5 μ Dicke, Strasburger). Bei Einwirkung von Quellungsreagentien (Alkalien, Chloralhydrat, Jodquecksilberjodkalium, Chromsäure) zeigen manche Schichten, daß sie aus feinen Lamellen bestehen. Außer Schichtung unterscheidet man spiralige Streifung und Querlamellierung, die sich durch die genannten Reagentien ebenfalls deutlicher (oft allerdings nur vorübergehend) sichtbar machen lassen. Die Differenzierungen können nach Correns (Lit. S. 497, 3), begründet sein: in der Membranskulptur, in einem sprungweise wechselnden Wassergehalt der Streifen und Schichten bei gleicher chemischer Zusammensetzung, bei gleichem Wassergehalt in chemischer Verschiedenheit und schließlich in einem ungleichen Wassergehalt und in chemischen Abweichungen.

Membrandifferenzierungen, die nur auf ungleichem Wassergehalt beruhen, müssen sich durch Austrocknen der Objekte zum Schwinden bringen lassen. Durch wasserentziehende Reagentien (absoluter Alkohol) läßt sich die Feuchtigkeit nicht vollständig entziehen, das Austrocknen muß im Trockenschrank bei 60—100° vorgenommen werden. Bei der Austrocknung tritt zuweilen eine Gestaltsveränderung ein. Die Wirkung des Austrocknens wird an Vergleichspräparaten festgestellt, die entweder trocken unter Deckglas gebracht oder in Kanadabalsam untersucht werden, welches nahezu den gleichen Brechungsindex wie die Zellwand besitzt. Correns benutzt zum Nachweis Silber- und Eisensalze. Diese werden von den wasserreichen Schichten am reichlichsten aufgesaugt. Die aufgenommenen Metalle werden fixiert. Versuchsobjekte: mit Wasser ausgewaschene Bastfasern von Nerium und Vinca. Versilberungsverfahren S. 497 (2 % Silbernitrat, leicht abtrocknen, 0.75

Kochsalz, Wasser, Belichtung). Berlinerblaureaktion: die gut ausgewaschenen Schnitte werden bei 100° getrocknet, dann 10 % Ferrocyankalium (einige Min.), oberflächliches Abwischen, verd. Eisenchlorid (einige Sek.), Austrocknen, Kanadabalsam.

Beruhen Membrandifferenzierungen auf chemischen Ursachen, so bleiben Streifen und Schichten nach dem Austrocknen in gleicher Schärfe sichtbar. Zur Färbung kann Bismarckbraun dienen (konz. Lösung in 70 % Alkohol, Einwirkung 20—30 Min., abs. Alkohol, Xylol, Balsam). Meist wird zugleich mit chemischen Differenzen ein ungleicher Wassergehalt verbunden sein. Durch beide Faktoren kommt nach Correns die Querlamellierung der Bastfasern zustande. Die radial laufenden Lamellen sind gewöhnlich stark lichtbrechend und bleiben in Methylenblau farblos, während sich die übrige Membran stark färbt. Durch Kaliumchlorat-Salpetersäure wird die starke Lichtbrechung der Querlamellen aufgehoben und die Membran nimmt Methylenblau nun gleichmäßig an. Wahrscheinlich ist der, die Lamellierung bedingende Stoff durch das Mazerationsgemisch herausgelöst worden. Die Streifung der Epidermiswände bei Hyacinthus und Ornithogalum nutans sowie die schräge Streifung der Bastfasern[1]) soll nach Correns auf einem ungleichen Wassergehalt der einzelnen Schichten beruhen. Manche Bastfasern besitzen eine feine spiralige Streifung, die aber beim Austrocknen deutlicher hervortritt. Ähnliches sehen wir bei Trichomen (Pennewar Djambi). Werden ausgetrocknete Haare mit der Nadel verletzt, dann reißt die Membran in der Richtung der Streifen ein und die gesamte Wand rollt sich spiralig auf. Die gleiche Erscheinung erzielt man mit konz. Kalilauge oder mit anderen stark quellend wirkenden Reagentien. Hier zeigt die Streifung die Richtung der spiralartig angeordneten Membranlamellen an (Tunmann, Lit. S. 94, $_2$).

Derartige Erscheinungen lassen sich diagnostisch verwerten. Weizenhaare zeigen beim Einlegen in konz. Salzsäure (spez. Gew. 1.19) oder in 50 % Kalilauge Spiralbildung, nicht aber die Haare von Roggen, Einkorn und Gerste. Rosenthaler[2]) führt diese Eigenschaft bei Triticum auf chemische Ursachen zurück. Anderseits kann vorhandene Streifung durch Einwirkung ganz bestimmter Reagentien zum Schwinden gebracht werden, die Streifung der Fasern von Pouzolzia verschwindet nur bei Einwirkung von Kupferoxydammoniak, die der Boueafasern nur durch Kalilauge (Aisslinger, Lit. S. 540, $_5$).

[1]) Diagnostisch wichtig. Bei Linum bilden die Streifen mit der Längsachse der Faser einen Winkel von 10°, 21, bei Cannabis nur von 3°, 66 (P. Sonntag, Ber. bot. Ges., 1911, XXIX, 669).

[2]) L. Rosenthaler, Verhalt. d. Haare einig. Getreidearten gegen Salzsäure, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1910, XX, S. 369.

Die Außenwände der Oscillarien zeigen Netzstruktur (Kolkwitz) erst nach Vorbehandlung und Färbung. Correns[1]) behandelt das Material nacheinander mit Pepsin-Glyzerin-Salzsäure, Chromsäure, 2 % Kalilauge und färbt mit Karbolfuchsin. Bei weit geöffneter Irisblende sieht man ein rotes Netz auf farblosem Grunde.

Zellulose.

Zellulose steht unter den membranaufbauenden Stoffen an erster Stelle. Sie ist oft, auch in den sog. Zellulosemembranen, mit wechselnden Mengen von Hemizellulosen u. a. vereint. Den meisten Pilzen (und Bakterien) fehlt Zellulose, in manchen Geweben tritt sie stark zurück, in Korklamellen scheint sie zu fehlen. Die chemische Erforschung begann mit Payen, der den Membranstoff benannte. Wir bezeichnen jetzt mit Zellulose jene Membranstoffe, die sich mit verd. Säuren (2 %) nicht hydrolysieren lassen und bei Behandlung mit völlig konz. Schwefelsäure Traubenzucker liefern (Dextrozellulose, E. Schulze 1889). Somit zählt Zellulose zu den Polysacchariden. Durch Oxydationsmittel gibt sie Oxyzellulose, mit mäßig verd. Schwefelsäure und mit Chlormetallen Hydrozellulose. Ihre Konstitution ist noch nicht geklärt, vielleicht liegt ein inneres Anhydrid des Traubenzuckers vor. Payen schreibt $C_6H_{10}O_5$, Cross und Bevan treten für $C_{12}H_{20}O_{10}$ ein. Kristallisierte Zellulose hat Gilson dargestellt, unreine Zellulosepräparate erhält man bei der „Rohfaserbestimmung".

Zuweilen erfolgt Bildung von Zellulose innerhalb der Zelle. Hierher zählen: die Bildungen in der Samenschale von Cuphea, die Zellulosebalken in Caulerpa und in den Embryosäcken, die Umhüllung verschiedener Oxalate und die Klumpenbildung in den von der endotrophen Mykorrhiza befallenen Zellen von Neottia nidus avis, Psilotum u. a.. In den letztgenannten Fällen wird der Zelluloseballen von einer Schicht abgestorbener Hyphen lose umhüllt.

Zellulosemembranen erscheinen bei mikroskopischer Betrachtung hell und schwach lichtbrechend, im polarisierten Lichte doppelbrechend; die ultramikroskopische Prüfung zeigt, daß sie aus parallelen Reihen kleiner und schwach leuchtender Micellen bestehen, zwischen denen sich optisch leere Reihen finden. Gaidukov (Lit. S. 439) hat Ramiefasern, leere Zellen von Oedogonium u. a. näher ultramikroskopisch untersucht.

Beim mikrochemischen Nachweis der Zellulosemembranen stehen an erster Stelle die Reaktionen mit Kupferoxydammoniak und mit Jod-Schwefelsäure. Lösungsreaktionen werden mit Kupferoxydammoniak, Schwefelsäure und mit Chromsäure ausgeführt.

Die Reaktion mit Kupferoxydammoniak wurde von Schweizer[2]) 1857 aufgefunden; er stellte sein Reagens in der Weise her, daß er aus einer Kupfer-

[1]) C. Correns, Über die Membran und die Bewegung der Oscillarien, Ber. deutsch. bot. Ges. 1897, XV, S. 139.

[2]) E. Schweizer, Journ. prakt. Chem., 1857, LXXVI, S. 109.

sulfatlösung mit verd. wässer. Natronlauge Kupferoxydhydrat ausfällte, dieses mit Wasser gut auswusch und dann in konz. Ammoniak auflöste. Die von de Toni[1]) gegebene Vorschrift liefert kein wesentlich besseres Reagens, ist aber einfacher in der Ausführung. Man mischt 10.0 g fein zerriebenes reines Kupfersulfat mit 2.0 g kaustischer Soda (Natriumhydroxyd) und einigen Tropfen Wasser, fügt 25 bis 40 ccm konz. Ammoniaklösung zu und filtriert durch Glaswolle. Fitting[2]) änderte die Vorschrift von Schweizer etwas ab. Kupferhydrat wird aus Kupfersulfatlösung mit Ammoniak ausgefällt, gesammelt, gut mit Wasser ausgewaschen und alsdann in möglichst wenig Ammoniak gelöst. Eine derartige Lösung soll mehrere Wochen brauchbar bleiben. Die Lösung kann ferner aus Kupferoxyd hergestellt werden. Man übergießt Kupferspäne mit starkem Ammoniak, so daß die Späne gerade bedeckt sind, und läßt die Flüssigkeit in geöffneter Flasche einige Stunden stehen (W. Behrens, Tabellen, Braunschweig, 1887, S. 55). Hierbei ist Zusatz von etwas Ammonium chloratum vorteilhaft. — Das Reagens besitzt seine volle Wirksamkeit selbst bei sachgemäßer Aufbewahrung (Lichtabschluß) nur wenige Wochen und ist brauchbar, wenn es Baumwolle in kurzer Zeit auflöst. Nimmt man den Lösungsversuch unter Deckglas vor, so muß das Reagens wiederholt durchgesaugt werden.

Nur wenn Membranen vorliegen, die fast ganz aus Zellulose bestehen und die nicht von derben Kutikular- oder Korkschichten geschützt werden, kann man an zarten Präparaten, die aus wenigen Zellen bestehen, die Reaktion (öfteres Durchsaugen) unter Deckglas ausführen. Es ist bei Geweben jedoch vorteilhafter, die Schnitte in einem bedeckten Schälchen zu mazerieren. Derart läßt sich bei dünnen Schnitten aus parenchymatischen Geweben in 2 bis 4 Tagen, aus verholzten Elementen in einer Woche sämtliche Zellulose entfernen. Bei Membranen, die überwiegend aus Zellulose bestehen, zeigen Vergleichspräparate ohne weiteres die Wirkung des Reagens. Sind in einer Membran neben der Zellulose Pektine, Hemizellulosen u. dergl. stark vertreten, oder ist die Membran verholzt, so kann man bei optischer Betrachtung von einer Lösung der Zellulose oft nichts erkennen. Man muß durch weitere Reaktionen die Abwesenheit der (herausgelösten) Zellulose feststellen. Aus den mazerierten Schnitten wird das Kupfersalz durch gutes Auswaschen mit 4—5% Essigsäure entfernt. Die für Zellulose charakteristischen Jodreaktionen und Färbungen (s. unten) müssen nun negativ ausfallen. Vergleichspräparate gestatten sofort ein sicheres Urteil.

Nach Gilson[3]) läßt sich die Zellulose aus ihrer Kupferoxydammoniaklösung durch 20—23% Ammoniak kristallinisch ausfällen.

---

[1]) G. B. de Toni, Acci Ist. Ven. Sc. Lett. ed Art., 1906, LXV_2, S. 593.

[2]) H. Fitting, Bau u. Entwickl. d. Makrosporen v. Isoetes u. Selaginella u. ihre Bedeut. für d. Wachst. pflanzl. Zellmembr., Bot. Ztg., 1900, LVIII, S. 107.

[3]) E. Gilson, La cristall. de la cellulose et la composition chimique de la membrane cellulaire végétale, La Cellule, 1893, IX, S. 397.

Diese Eigenschaft wurde zum mikrochemischen Nachweis (auch zur makrochemischen Gewinnung) **kristallinischer Zellulose** herangezogen. Der mikrochemische Nachweis wird dadurch ermöglicht, daß die Zelluloselösung nicht durch die pektinhaltigen Mittellamellen diosmieren kann. Die Versuche sind langwierig und gelingen nicht immer gleich. Sie wurden von Johnson[1]), Love[2]) und van Wisselingh bestätigt. Man benutzt möglichst stärkefreie oder doch stärkearme Parenchymgewebe krautartiger Stengelteile oder Wurzeln. Von den Zellinhalten werden die Präparate durch Behandeln mit Eau de Javelle befreit. Vom Eau de Javelle müssen die Schnitte durch gutes Auswaschen befreit werden. Fette sind durch Alkohol-Äther zu entfernen. Die vorbehandelten Präparate kommen auf 6—12 Stunden in einem hermetisch verschlossenen Gefäße in Kupferoxydammoniak. Die Flüssigkeit wird nach genügender Einwirkung vorsichtig abgegossen und durch 10 % Ammoniak ersetzt. Das Ammoniak wird wiederholt durch neues (jetzt 20 %) ersetzt. Schließlich werden die Schnitte, die leicht auseinanderfallen und daher vorsichtig zu behandeln sind, mit Wasser nachgewaschen. Sie sind nun farblos, zeigen im Zelllumen kleinkörnige, krümelige oder dendritische Kristallmassen, die sich in Kupferoxydammoniak lösen, unlöslich in verd. Alkalien und Säuren sind und sich mit Kongorot rot färben. Mit Chlorzinkjod werden sie blau, besonders nach Vorbehandlung mit verd. Salzsäure. Durch verd. Säuren werden die Präparate wesentlich aufgehellt, die Kristalle treten weit deutlicher hervor. Johnson bezeichnet sie als Kristallite, da sie auf das polarisierte Licht nicht einwirken. Die Kristallform ist abhängig von der Konzentration des zum Auswaschen benutzten Ammoniaks. Bei Verwendung von 5 % Ammoniak entstehen überwiegend kleine Sphärokristalle, bei stärkerem Ammoniak (20 %) erhält man die größten Kristallaggregate.

Zellulose löst sich in konzentrierter Schwefelsäure oder richtiger, die Zellulose wird durch Schwefelsäure in Traubenzucker übergeführt. Diese Reaktion ist weniger charakteristisch, da sich gleichzeitig Hemizellulosen, Pektine und oft verholzte Membranen in Schwefelsäure lösen, während in Kupferoxydammoniak sich nur die Zellulose löst. Der Einwirkung der Schwefelsäure wird in zweifelhaften Fällen eine Mazeration oder ein Aufkochen mit Wasser voranzugehen haben. Sind in abgestorbenen oder getrockneten Geweben von den Membranen Gerbstoffe oder Phlobaphene in großer Menge

---

[1]) D. S. Johnson, The cristallization of cellulose, Bot. Gazette, 1895, XX, S. 16.

[2]) E. G. Love, Note on the staining of cellulose, Journ. New-York Microsc., 1894, X, S. 70.

gespeichert worden, so kann die Membran resistent gegen Schwefelsäure sein. Ähnliches gilt von Alkoholmaterial. So berichtet Lidforss (Lit. S. 182, 2), daß bei Primula farinosa (Blütenstandsachse) die Wände gewisser Idioblasten sich in Schwefelsäure und Chromsäure (bei Alkoholmaterial) wie Kork verhielten, während sie sich bei lebendem Material in diesen Reagentien auflösten, und Debski (Lit. S. 147, 4) erwähnt Zellwände bei Blättern der Marantaceen, die sich in frischem Zustande leicht in Schwefelsäure lösen, durch Alkohol aber gebräunt und unlöslich in Schwefelsäure werden. Man verwende möglichst kleine, nur wenige Zellen große Präparate und setze die Säure dem trocken unter Deckglas oder doch nur in wenig Wasser liegenden Schnitte zu. Auch ist darauf zu achten, daß die Schwefelsäure wirklich konzentriert ist (s. S. 11 ob.). Verschiedene (irrtümliche) Literaturangaben über Unlöslichkeit in Schwefelsäure beruhen auf Benutzung schlecht aufbewahrter Säure. Im allgemeinen sind nach Russow (Lit. S. 440, 1) Zellulosemembranen der Wasserpflanzen resistenter gegen Säure als die von Landpflanzen; Angaben aus neuerer Zeit fehlen hierüber.

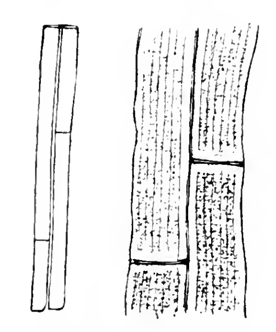


Fig. 123. Bastfaser, vor und während der Einwirkung von konz. Schwefelsäure: Plasmaschlauch und Tüpfelfüllungen treten hervor (Tunmann).

Chromsäurelösung, die je nach ihrer Konzentration Zellulose schnell auflöst, wird nur nebenbei zur Charakteristik herangezogen, da sie verholzte Membranen u. a. ebenfalls löst.

Chlorzink-Essigsäureanhydrid (Chlorzink in der zweifachen Gewichtsmenge Essigsäureanhydrid gelöst) soll nach Cross und Bevan[1]) ebenfalls Zellulose lösen. Czapek (Biochemie I, S. 526) und Tschirch (Handbuch II, S. 242) geben (irrtümlicherweise) an, daß sich Zellulose in Chlorzinksalzsäure (1 + 2) lösen soll. Nachprüfungen an Baumwolle und an Geweben ergaben, daß Chlorzink weder mit Essigsäureanhydrid noch mit Salzsäure mikrochemisch Vorteile bietet. Hanausek[2]) hat eineLösung mit Salzsäure-Essigsäureanhydrid nicht erzielen können, hält das Reagens aber für geeignet, um die feineren Strukturverhältnisse der Membran hervortreten zu lassen.

Die während der Lösung auftretenden Bilder sind recht charakteristisch; selbst die feinsten plasmatischen Reste (Plasmabeläge der Bastfasern und Gefäße) werden sichtbar (Fig. 123). Zum Studium der Lösungsvorgänge diente auch Schwefelsäure in Verbindung mit Jod oder mit Kaliumdichromat. Die Chromatschwefelsäure (S. 98 u. 454)

[1]) Cross und Bevan, Chem. News, LXIII, S. 66.

[2]) T. F. Hanausek, Kleine Mitteilungen IV, Lösungsmittel der Zellulose Chem. Ztg., 1894, XVIII, S. 441.

hat Hanausek[1]) zur Unterscheidung der Lein- und Hanffaser benutzt. Bei Linum tritt der Plasmaschlauch wellenförmig und unregelmäßig gewunden hervor, bei Cannabis erscheint er mit geradem Verlauf. Die sekundären Verdickungsschichten von Cannabis bleiben weit länger erhalten als die von Linum. Nur der Hanffaser ist an der Außenseite eine bräunliche sekretartige Masse aufgelagert, die sehr resistent ist. Bekannt sind die Lösungserscheinungen in Kupferoxydammoniak, welche die mit kutinisierten und verholzten Außenmembranen versehenen Trichome und Fasern zeigen. Das Reagens kann auf die inneren zellulosehaltigen Schichten nur an den verletzten Stellen der Kutikula und der primären Membran einwirken; an diesen Stellen tritt die Zellulose bei der Lösung blasenförmig heraus und preßt die nicht angreifbaren äußeren Schichten beiseite. Gleichzeitig wird der Plasmaschlauch gut sichtbar (Fig. 124).

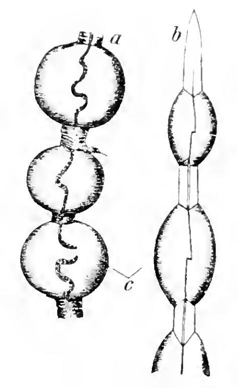


Fig. 124. Einwirkung von Kupferoxydammoniak auf Gossypium (a) und Cinnamomum camphora (b): blasenartiges Hervorquellen der Zellulose bei c (Tunmann).

Von verd. und konz. Alkalien, verd. und konz. Salpetersäure, von Schultzeschem Gemisch wird Zellulose nicht gelöst, doch erfolgt Quellung, wodurch feinere Strukturverhältnisse besser sichtbar werden. Verd. und konz. Salzsäure löst (selbst beim Aufkochen) nicht; dadurch unterscheidet sich die Zellulose von den Hemizellulosen (s. d.).

Reine Zellulose färbt sich mit Jodjodkalium oder mit alkoholischer Jodlösung gelblich bis schwach braun. Durch mäßig verd. Schwefelsäure (70—95 %) wird Zellulose unter Gallertbildung in Hydrozellulose übergeführt und diese wird von Jodreagentien gebläut. Hierauf beruht der beste mikrochemische Nachweis der Zellulose mit **Jod-Schwefelsäure,** der 1838 von Schleiden angegeben wurde, nachdem Gmelin[2]) vorher (1830) die gleiche Reaktion mit Papier ausgeführt hatte. Man benutzt eine jodarme Jodjodkaliumlös. (0.3 J, 1.5 KJ, 100.0 Wasser) und eine mäßig verd. Schwefelsäure (3 + 1 Wasser). Bei Verwendung konzentrierterer Lösungen treten störende Jodausscheidungen auf und die Präparate lösen sich zu schnell in der Säure. Die Schnitte werden mit der Jodlösung gut durchtränkt, bleiben einige Zeit liegen, dann wird ein kleiner Tropfen Wasser und schließ-

[1]) T. F. Hanausek, Eine neue Methode zur Unterscheidung der Flachs- und Hanffaser, Ztschr. f. Farbenind., 1908, Heft 7, Sep.

[2]) J. M. Schleiden, Pogg. Ann. 1838, XLIII, S. 391 u.: Gmelin, Schweigg. Journ., 1830, LVIII, S. 374.

lich die Säure zugefügt. Unter Quellung und Gallertbildung nehmen alle Zellulosemembranen eine starke Blaufärbung an. Schließlich, besonders bei Gegenwart von viel konz. Säure, findet völlige Lösung und Entfärbung statt. Bei der Reaktion mit Jodschwefelsäure sowie bei den im folgenden angeführten Jodreaktionen darf nun nicht vergessen werden, daß sich außer Zellulose auch verschiedene Hemizellulosen (nicht sämtliche) ebenfalls blau färben. Bei diesen tritt meist die Blaufärbung mit Jod bereits bei Gegenwart einer sehr stark verd. Säure ein (zuweilen genügt die Anwesenheit von viel Jodwasserstoffsäure). Reine Zellulose beansprucht zur Jodschwefelsäurereaktion eine mindestens 50% Säure (1 + 1 Wasser), gebraucht wird meist eine 75%.

Um den Nachteil der Jod-Schwefelsäure-Reaktion, das Auflösen der Präparate, zu beheben, sind weitere Reaktionen eingeführt worden, die ebenfalls die Zellulose mehr oder weniger vollständig in Hydrozellulose überführen und letztere durch Jod färben. Man benutzt Phosphorsäure und Chlormetalle mit Jodzusatz, so daß Überführung in Hydrozellulose und Färbung gleichzeitig ausgeführt wird. Von diesen Reaktionen hat sich in erster Linie die mit **Chlorzinkjod** eingebürgert, welche Schultze[1]) zuerst auffand. Die Präparate werden direkt in das Reagens eingetragen. Zellulosemembranen färben sich, oft erst nach längerer Zeit, mehr oder weniger violett. Die Wirkung des Reagens wird wesentlich modifiziert von dem Alter der Lösung und von dem Gehalt an Chlorzink.

Chlorzinkjod ist, in brauner Glasstöpselflasche aufbewahrt, mehrere Jahre brauchbar. 20.0 g Chlorzink, 6.5 g KJ, 1.3 g J, 10.5 g Wasser. Ein nach dieser Vorschrift (W. Behrens, Tabellen) bereitetes Reagens enthält etwa 52% Chlorzink. Besser wirkt folgende Lösung: 25.0 g Chlorzink, 8.0 g KJ, 1.5 g J, 8.0 g Wasser; sie enthält ungefähr 60% Chlorzink. Man kann schließlich 2 getrennte Lösungen vorrätig halten[2]). Die Schnitte kommen auf wenige Sekunden in Lösung I (Jodjodkalium, 1 + 1 + 100) und werden in einen großen Tropfen Lösung II (Zinkchlorid 2, Wasser 1) übertragen. Bei zu schwacher Färbung muß nochmals Jodjodkalium zugesetzt werden.

Weitere Jodreagentien auf Zellulose hat Mangin[3]) empfohlen. Allgemeiner in Aufnahme ist Jodphosphorsäure gekommen. Die Schnitte gelangen direkt in das Reagens, reine Zellulosemembranen werden kräftig violett gefärbt. Präparate, die zuvor in Wasser ge-

[1]) Nach L. Radlkofer, Liebig Ann., 1855, XCIV, S. 332.

[2]) J. Nowopokrowsky, Über die Chlorzinkjodreaktion der Zellulose, Bull. Jard. imp. bot. St. Pétersbourg, 1911, XI, S. 109.

[3]) L. Mangin, Sur les réactifs jodés de la cellulose, Bull. Soc. bot. de France, 1888, XXXV, S. 421 u.: Observat. s. l. développement du pollen, Bull. Soc. bot. de France, 1889, XXXVI, S. 274.

legen haben, werden durch Betupfen mit Fließpapier abgetrocknet. Man gebraucht eine möglichst konz. Phosphorsäure, die sich aus der Handelsware durch Eindampfen auf dem Wasserbade leicht herstellen läßt. Die Säure muß wenigstens 50% Orthophosphorsäure enthalten: sie hat dann Sirupkonsistenz (20 ccm Säure, 0.5 KJ, 0.2 J, ein Erwärmen zwecks völliger Lösung ist nicht nötig, ein Überschuß an Jod nicht schädlich). Die Säure kann auch während der Reaktion verstärkt werden. Man bringt die Schnitte in Jodphosphorsäure und bedeckt sie mit einem Kristall kristallinischer Phosphorsäure. Der Kristall löst sich langsam auf, die Zellulosewände treten, besonders wenn sie vorher mit verd. Eau de Javelle gereinigt wurden, dunkelblau hervor.

Nach Grüss (Stud. üb. Reservezellulose, Bot. Centrbl., 1897, LXX, S. 242) läßt sich Jodphosphorsäure aus der in Stangenform erhältlichen Phosphorsäure bereiten, die man bis zur Sirupkonsistenz in Wasser löst; die Lösung wird mit einigen Körnchen Jodkalium und Jod versetzt. Das Reagens ist in kurzer Zeit gelbbraun.

Chlorkalzium-Jodlösung gibt gute Erfolge und färbt reine Zellulosewände erst rosenrot, später violett. Das Reagens wird (Zimmermann, Mikrot. S. 138) hergestellt aus 10 ccm konz. Chlorkalziumlösung, 0.5 g KJ, 0.1 g J. Durch schwaches Erwärmen wird ein Teil Jod gelöst und die Lösung durch Glaswolle vom überschüssigen Jod abfiltriert. Nach angestellten Nachprüfungen schadet aber das überschüssige Jod im Reagens nicht, die Lösung war nach einem Jahre noch wirksam (Lichtabschluß).

Schneller als Chlorzinkjod soll nach Mangin Aluminiumchlorür und Jod wirken, die Färbung soll sich einige Tage halten. Metallisches Aluminium wird in Salzsäure gelöst, die Lösung bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und mit 1% J und 0.5% KJ versetzt. Färbt dunkelblau bis violett. Eine himmelblaue Färbung soll Jodzinnchlorid geben. Spiritus fumans Libavii (gewonnen durch Überleiten von Chlor über erwärmtes Zinn oder Zinnchlorür) wird durch möglichst wenig Wasser zersetzt, dann mehr Wasser zugefügt, ohne daß es zur Lösung kommt, und schließlich werden einige Tropfen einer Lösung von Jod und Chlorkalium in Wasser zugefügt. Die Reaktion gelingt nicht gut.

Zur Reinigung der Zellulosemembranen benutzt van Wisselingh Glyzerin. Die Schnitte kommen in kleine Glasröhrchen mit Glyzerin, die Röhrchen werden zugeschmolzen und bis auf 300° erhitzt, was innerhalb $^1/_2$ Stunde ausgeführt werden kann (Ausführung s. Chitin). Reine Zellulose wird nicht angegriffen, wohl aber werden sehr viele Bestandteile entfernt (nicht gelöst, sondern zersetzt). Hauptsächlich Hemizellulosen (Amyloid) widerstehen aber ebenfalls der Glyzerineinwirkung. Das Reinigungsverfahren, das auch durch Maze-

ration mit verd. Alkalien und Eau de Javelle ausgeführt werden kann, dient besonders zur Erzielung guter Jodfärbungen und zum Nachweis von Zellulose neben anderen Membranstoffen.

Färbungen mit Farbstoffen treten ganz allgemein beim Nachweis der Zellulose sehr zurück. Farbstoffe, die lediglich Zellulose färben, gibt es gegenwärtig nicht. Die Intensität der Farbstoffspeicherung hängt keineswegs von dem größeren oder geringeren Gehalt der Membran an Zellulose ab. Hat doch van Wisselingh[1]) gezeigt, daß sich die Haare von Gossypium mit Kongorot nur schwach färben, während nach kurzer Vorbehandlung mit Kupferoxydammoniak und nach gutem Auswaschen eine stärkere Färbung mit Kongorot erzielt wird. Zellulosearme Wände können sich stärker färben als zellulosereiche. Denn bei der Farbstoffaufnahme sind physikalische Faktoren (Dichte der Membran) hervorragend beteiligt. Immerhin lassen sich als Hilfsreaktionen auch Färbungen heranziehen, die besonders für Dauerpräparate geeignet sind. Am meisten benutzt werden Kongorot und Hämatoxylin.

Für Kongorot, welches Klebs[2]) als Reagens auf Zellulose bei Algen und Flagellaten bezeichnete, hat Heinricher[3]) gefunden, daß der Farbstoff auch Hemizellulosen und Schleime färbt. Die Ergebnisse der Färbung sind verschieden, je nachdem eine wässerige oder eine alkoholische Lösung benutzt wird. Bei Benutzung einer alkoholischen Lösung werden auch verholzte Elemente gefärbt. In der konz. wässer. Lösung bleiben die Schnitte einen Tag, werden in Alkohol abgespült und in Kanadabalsam eingeschlossen.

Hämatoxylin färbt außer Zellkern und plasmatischen Teilen auch unverholzte und unverkorkte Wände. Reine Zellulosemembranen werden violett gefärbt, verholzte, verkorkte und kutinisierte Wände bleiben ungefärbt oder werden nur gelb bis braun. Die Hämatoxylinfärbung der Zellulose betrachtet Giltay[4]) als spezifisches Zellulosereagens, welches in sehr vielen Fällen der Chlorzinkjodreaktion vorzuziehen sei. Es sei bemerkt, daß der Torus durch Hämatoxylin (S. 453) gefärbt und auch von Phlorogluclnsalzsäure gerötet wird.

[1]) C. van Wisselingh, Mikrochem. Untersuch. über die Zellwand d. Fungi, Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXI, S. 619.

[2]) G. Klebs, Organisation d. Gallerte bei Algen u. Flagellaten, Unt. bot. Inst. Tübingen, 1886, II, S. 369.

[3]) E. Heinricher, Ist das Kongorot als Reagens auf Zellulose brauchbar? Ztschr. f. wiss. Mikr., 1888, V, S. 343.

[4]) E. Giltay, Über das Verhalten von Hämatoxylin gegen Pflanzenmembranen, Ak. Wet. Amsterdam, 27. X. 1883, S. 2.

Zellulosefführende Membranen, die mehr oder weniger große Anteile an Hemizellulosen führen und nicht verholzt sind (Zellulosemembran schlechthin), speichern die verschiedensten Farben. Selbstverständlich können diese Färbungen ebenso wenig als typische Zellulosereaktionen angesehen werden, wie die vorher angeführten. Chalon[1]) spricht allerdings Methylenblau als typischen Zellulosefarbstoff an. Porsch benutzt zum Zellulosenachweis essigsaures Anilinblau, Lagerheim Brillantblau. Eine Unzahl Farbstoffe färbt Zellulose, ohne daß eine Beize nötig ist (substantiv). Vorbehandlung mit Säuren oder Alkalien verstärkt die Färbung. Man benutzt daher bei vielen Farben saure (bei Orseillerot, Naphtholschwarz, Azorubin u. a.) oder alkoholische (bei Brillantpurpurin, Benzopurpurin, Benzoazurin u. a.) Bäder. Zuweilen wird in neutralem Bade gefärbt, die gespeicherten Farben werden nachher durch Säuren weiter differenziert.

Doppelfärbungen.

Das Färbungsvermögen ist nicht auf Zellulose (und Hemizellulose) beschränkt. Es färben sich alle Membranen, auch die verholzten (s. d.) und die verkorkten (s. d.) mit bestimmten Farbstoffen. Man behandelt daher die Schnitte mit Farbstoffgemischen oder nacheinander mit verschiedenen Farben und erzielt Doppelfärbungen, welche, da sie haltbar sind, sich für Dauerpräparate zu Demonstrationszwecken eignen. Auch bei histologischen Untersuchungen, besonders bei zarten Geweben (Vegetationspunkten, Samenknospen) werden Färbungen benutzt. Doch lassen sich aus den Färbungen allein nur annähernde Schlüsse auf die chemische Zusammensetzung einer Membran ziehen. Überwiegend wird mit Anilinfarben gefärbt, zuweilen wird die Metallspeicherung herangezogen. Die Zeitdauer der Einwirkung der Farbstoffe ist abhängig von den Präparaten, ihrer Vorbehandlung (Fixierung), von der Konzentration der Farblösungen und vielen anderen Faktoren. Teils wird überfärbt (die Präparate gelangen in konz. Lösungen) und dann wird gut ausgewaschen, teils läßt man verd. Lösungen längere Zeit einwirken. Zuweilen erfolgt eine Nachbehandlung zur Erzielung weiterer Farbentöne. Die gefärbten Schnitte werden entwässert und in Kanadabalsam eingebettet oder gelangen über Glyzerin in Glyzeringelatine. Aus der Unzahl der vorgeschlagenen Doppelfärbungen seien nur einige Methoden angeführt. Es gibt noch weit mehr brauchbare Methoden (zum Teil sind sie an anderen Stellen dieses Buches angeführt); ein jeder kann sich dergl. durch passende

[1]) I. Chalon, Coloration des parois cellulaires, Bull. Soc. roy. Bot. Belg., 1898, XXXVI, S. 12 u. XXXVII, S. 59.

Vereinigung von Farbstoffen, die Holz, Kork und Zellulose färben, leicht selbst ausarbeiten.

Chodat benutzt eine schwach ammoniakalische 1% Lösung von Kongorot, der 1% Chrysoidin zugefügt ist (Holz strohgelb, Kork goldgelb, Zellulose kirschrot). Eine Doppelfärbung, bei der Holz blau, Zellulose rot wird, läßt sich durch konz. alkoholische Cyaninlösung mit 5% Zusatz einer ammoniakalischen Kongorotlösung erzielen (Roulet)[1]. Mit Hämalaun und Naphthylamingelb färbt Pfeiffer[2]) (Holz gelb, unverholzte Membran violett). Man kann auch die Schnitte nacheinander in die beiden Farblösungen bringen, zuerst auf eine Stunde in Hämatoxylin und dann in eine Lösung von Anilinblau, Methylblau oder Bismarckbraun. Die Schnitte werden mit Alkohol ausgewaschen und in Kanadabalsam eingebettet (Holz rot, Zellulose violett bis blau). Das Lagerheimsche[3]) Farbstoffgemisch besteht aus Sudan III, Brillantblau und Chloranilin. In einer Lösung von Jodgrün und Grenachers Alauncarmin wird Zellulose rot, Holz und Kork grün. Arcangeli[4]) verwendet zur haltbaren Färbung 4 Teile einer 0.5% Methylgrünlösung und 1 Teil einer 5% Fuchsinlösung. Chalon (Lit. S. 553, 1) benutzt Preußischblau-Safranin oder Anilinblau-Magentarot. Persico (Orseillefarbstoff)-Essigsäure in konz. Lösung färbt Zellulose nur sehr schwach[5]), Bast und Sklerenchym stark rotviolett (Chromatophoren und Zellkern braunpurpurn), die Färbung ist haltbar in Glyzerin, gesättigtem Kaliumazetat und in venetianischem Terpentin. Persico-Essigsäure wird ferner empfohlen in Verbindung mit Kernschwarz oder Nigrosin (Kollenchym schwarzviolett), mit Methylgrünessigsäure (Sklerenchym und Kollenchym fleischrot, Glycerineinbettung), mit Gentianaviolett (Plasma, Zellkern rotbraun, Membran blauviolett, Terpentineinbettung).

Zum Färben der jüngsten Zellwände (Vegetationsspitzen) empfehlen van Leeuwen-Reijnvaan[6]) eine Kernschwarz-Methode. Mikrotomschnitte kommen auf 1½ Stunden in Kernschwarz (Grübler)

[1]) Ch. Roulet, Nouv. proc. de double-col. d. membr., Arch. d. sc. phys. et nat. Genève, 1893, XXIX, S. 100.

[2]) H. Pfeiffer, Neue Doppelf. für Gewebe mit teilweise verholzten Membr., Ztschr. f. wiss. Mikr., 1897, XIV, S. 202.

[3]) G. Lagerheim, Techn. Mitt., Zschr. wiss. Mikr., 1897, XIV, S. 350.

[4]) A. Arcangeli, Studi dello Czapek sui tess. lignif., Bull. S. Bot. ital., 1899, S. 167.

[5]) G. Beck von Mannagetta, Über d. Verwend. d. Persico-Essigsäure z. mikr. Tinktionen, Sitzb. Lotos, 1904, Nr. 7.

[6]) W. u. J. van Leeuven-Reijnvaan, Färben d. j. Zellwände in Vegetationsp., Ber. d. bot. Ges., 1907, XXV, S. 470.

und dann auf 1—2 Tage in Safranin (1 g Safr., 100 ccm abs. Alkohol, 200 ccm Wasser) und werden mit salzsäurehaltigem Alkohol differenziert (Kernchromatin schwarz, Nukleolen rot, Plasma rosa. Zellwände hellrot). Die Färbung ist jahrelang haltbar. — Man kann auch mit Hämatoxylin (3—10 Minuten) und dann mit Lichtgrün (4—6 Minuten) färben (0.1 g Lichtgrün, 100 T. Wasser, 4 T. Formalin 40%) und mit 70% Alkohol abspülen. Zum Studium der Samenknospen dient Safraningentianaviolett. Zusatz von Orange G läßt die Pollenschläuche hervortreten [1].

Die Schließhaut der Hoftüpfel und der Torus lassen sich mit Hämatoxylin färben. Zimmermann (Mikrot., S. 139) benutzte Alkoholmaterial. Die Präparate (Versuchsobjekt Coniferenholz) kommen auf 15 Min. in Hämatoxylin (Böhmer), werden in Wasser abgeschwenkt, dann folgt Alkohol. Nelkenöl, Kanadabalsam. Innerhalb 5 Min. färbt das Hämatoxylin nur Zellkerne und die Schließhäute. Kowallik [2]) gibt folgendes Verfahren: Die Schnitte (Alkoholmaterial, Pinus) werden auf dem Objektträger 1 Min. in 1% wässer. Anilingrün (Brillantgrün? P. Wolff, Posen) erhitzt, mit Wasser abgespült und mit Chrysoidin (1% in 95% Alkohol, ev. mit Wasser verdünnt, 1 + 1) differenziert (1—2 Min.). Dann folgt, nach kurzem Umschwenken in 95% Alkohol. Färbung mit 1% Fuchsin S (Rubin S in 95% Alkohol, 1 Min.), abs. Alkohol (1 Min.), Xylol (5 Min.). Kanadabalsam. Tracheiden gelb. Hof grün, Torus glänzend rot.

Die Metallspeicherung wird zur Membran- und Doppelfärbung selten benutzt. Schon Mohl [3]) färbte Schnitte mit Blutlaugensalz und Säure, wollte aber dadurch, im Anschluß an einen Vorschlag von Boucherie, Nutzholz widerstandsfähiger machen. Strasburger [4]) färbte mit Berlinerblau-Oxalsäure (1.0 Berlinerblau, 0.25 Oxalsäure in 100.0 Wasser). Devaux (s. Pektinm.) färbt mit Berlinerblau und dann die verholzten Membranen mit Safranin oder Jodgrün. Die Speicherung der Metalle soll nicht der Zellulose, sondern den Pektinen zukommen. Zur Erlangung starker Färbungen muß man die Präparate erst mit Kalilauge behandeln. Petit [5]) wendet Bleiacetat und Kaliumdichromat an (die dünnen Wände werden gelb, ebenso färbt Eisenchlorid und Ammoniumsulfat), dann folgt Alkannafärbung (Kork, Kutikula rot) und schließlich Behandlung mit verd. wässer. Jodgrün (Holz grün).

---

[1]) Shattuck, Morph. stud. of Ulmus, Bot. Gaz., XL, S. 209.

[2]) G. Kowallik, Dauerfärbung der Hoftüpfel, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1911, XXVIII, S. 26.

[3]) H. v. Mohl, Bot. Ztg., 1843, I, S. 114.

[4]) Ed. Strasburger, Bot. Prakt., 1887, 1. Aufl., S. 622.

[5]) L. Petit, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1903, XX, S. 380

Tompa[1]) färbt mit Goldsalz. Die Reaktion benutzt die Reduktionsfähigkeit (Zinnchlorür auf Goldlösung). Die Präparate von Alkoholmaterial (von frischem nach zweitägiger Alkoholbehandlung) kommen auf 24 Std. in schwache Zinnchlorürlösung (0.5 ccm konz. Lösung[2]) in 10 ccm Wasser), werden mit durch verd. Salzsäure schwach angesäuertem Wasser abgespült und dann auf 10—30 Sek. in eine 0.1% wässer., mit verd. Salzsäure angesäuerte und auf 25° erwärmte Lösung von Aurum chloratum flavum gebracht. Nun folgt Abspülen mit schwach saurem Wasser, Glyzerinwasser (1 Tag), Alkohol steigernder Konzentration, Chloroform, Chloroformbalsam. Unverholzte Membranen nehmen Purpurfarbe an. — Bei der Färbung mit Saflor-Berlinerblau-Alkanna wird gleichfalls Alkoholmaterial (d. i. von Gerbstoff befreites) benutzt. Die Schnitte kommen in Saflortinktur[3]) (aus Crocus officinalis L. bereitet, gemeint ist wohl C. sativus L.?), dann nach dem Abwaschen mit Wasser auf 15—30 Sek. in 0.25% wässer. Eisenchlorid und nach leichtem Abspülen mit dest. Wasser in 0.5% wässer. gelbes Blutlaugensalz; nun folgt Abwaschen mit angesäuertem Wasser, Einlegen in heiße Alkannalös. (einige Sek.), Abspülen, wässer. Glyzerin, Glyzeringelatine. Kork, Kutikula rot, dickwandige und verholzte Wände gelb, dünne Membranen blau.

Callose.

Callose findet sich in den Callusplatten der Siebröhren, in Cystolithen (Grundsubstanz, S. 121), in mit kohlensaurem Kalk inkrustierten Wänden (bes. der Trichome), in Pollenkörnern (zwischen Intine und Exine bei Conif., Cyperac., Juncac., Lit. S. 121,1 u. S. 550,3), Pollenschläuchen (innerste Lamelle) und in vielen Pilzen (Peronosporeen). Sie ist stickstofffrei (im Gegensatz zum Chitin) und bildet in reinem Zustande (aus Bornetia corium) voluminöse Massen von der Zusammensetzung der Zellulose (Arnaud). Es gibt verschiedene Polymerisationsprodukte, zu denen zählt Tanrets Fongose.

Die Callose (Mangin[4])) unterscheidet sich von der Zellulose durch ihre Unlöslichkeit in Kupferoxydammoniak, von der Zellulose

[1]) A. v. Tompa, Zwei botanische Tinktionsmittel, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1903, XX, S. 24.

[2]) Zinnmetall (bleihaltige Stanniolfolien können ebenfalls benutzt werden) im Überschuß wird mehrere Stunden in verd. Salzsäure gekocht; die Lösung nebst Bodensatz, in gut schließendem Glase aufbewahrt, ist lange Zeit haltbar.

[3]) Die Bezeichnung gibt zur Verwechslung Anlaß. Unter Saflor versteht der Handel Flores Carthami (Carthamus tinctorius).

[4]) L. Mangin, Observ. s. présence de la callose chez les Phanerogames, Bull. Soc. bot. d. France 1892, 260 u.: Nouv. obs. s. callose, Compt. rend., 1910, CLI, 279.

und vom Chitin durch ihre leichte Löslichkeit in Glyzerin bei 280°; bei 250° bleibt sie noch ungelöst (van Wisselingh, Lit. S. 552, 1). Von den verschiedenen Modifikationen der Callose gibt die eine ohne Vorbehandlung charakteristische Reaktionen, die andere erfordert eine Vorbehandlung mit Alkalien oder Oxydationsmittel. Callose ist amorph, farblos, unlöslich in Wasser, Alkohol, Kupferoxydammoniak (auch nach Vorbehandlung mit Säuren), sowie in der Kälte in Alkalikarbonaten und Ammoniak; in den letzten Reagentien quillt sie auf. Sie löst sich leicht in konz. Schwefelsäure, kalter 1 % Kali- und Natronlauge, in Chlorkalzium und Zinnchlorid.

Beim Nachweis stehen Färbungen in erster Reihe. Die Calloseplatten der Siebröhren sind ohne Färbungen bei getrocknetem Material zuweilen nur schwer herauszufinden. Jodlösungen färben je nach ihrem Jodgehalt gelb bis rotbraun[1]), Chlorzinkjod rotbraun, Chlorkalziumjod rosa (Lecomte[2])). Russow (Lit. S. 524, 1) empfahl Anilinblau. Die Schnitte verweilen längere Zeit (20—40 Min.) in verd. wässer. Anilinblau und werden mit Glyzerin ausgewaschen. Man kann mit wässer. Eosin (einige Min.) nachfärben (Siebröhreninhalt und Plasmodesmen rot, Calloseplatten blau). Die Färbungen halten sich in Glyzerin, Glyzeringelatine und Kanadabalsam. Vielfach benutzt wird Corallin-Soda (Szyczylowicz [Bot. Centralbl., XII, 113], Corallin in konz. wässer. Natriumkarbonatlösung); der Farbstoff färbt in kurzer Zeit oder man überfärbt und wäscht mit 5 % Soda aus, wodurch Entfärbung eintritt und nur die Callose gefärbt bleibt (nicht haltbar).

Hier sei eingefügt die Fixierung des Inhalts lebender Siebröhren. Bei Präparation lebenden Materials wird der Inhalt der Siebröhren aus den mit relativ großen Öffnungen kommunizierenden Röhren zum Teil herausgepreßt; es entstehen Kunstprodukte, meist erscheint nur an einer Seite der Siebplatte der Inhalt als sog. „Schlauchkopf". Um den lebenden Zustand zur Anschauung zu bringen, taucht man (A. Fischer, Inhalt d. Siebröhren in unverletzten Pfl., Ber. d. bot. Ges., 1885, III, 230) lebende Pflanzen oder größere unverletzte Zweige in siedendes Wasser (2 bis 5 Min.). Der Siebröhreninhalt gerinnt. Zur besseren Präparation läßt man die abgebrühten Pflanzen, in kleinere Stücke zerschnitten, einige Stunden in Alkohol-Glyzerin liegen. Fischer unterscheidet verschiedene Modifikationen des Inhaltes: Siebröhren: a) mit gerinnbarem Saft (Cucurb., ein schwacher protoplasmatischer Wandbelag umschließt einen klaren, in der Hitze gerinnenden Saft); b) mit Schleim (Humulus, ein zarter, schleimführender Wand-

---

[1]) Die Angabe von Moore (Reactions of callus and paracallus, Journ. Linn. Soc. 1891, XXVII, S. 501), daß die Callose der Siebröhren (Cucurbitac.) Eiweißreaktionen gibt, ist fraglich.

[2]) H. Lecomte, Contribution à l'étude du liber des Angiospermes, Ann. d. sc. nat. Bot., Sér. 7, X, S. 193.

belag umschließt den klaren, nicht gerinnenden Inhalt); c) mit Stärkekörnern Coleus, der Wandbelag führt nur geringe Schleimmengen, im klaren, nicht gerinnenden Inhalt kleine Stärkekörnchen).

Azofarbstoffe, die in neutralem oder schwach saurem Bade die Zellulose stark färben, lassen die Callose ungefärbt (Orseillin BB, Azorubin, Naphtholschwarz, Crocein). Hingegen wird die Callose von Farbstoffen der Benzidinreihe (Kongorot, Deltapurpurin, Brillantpurpurin, Benzopurpurine, Heliotrop, Benzoazurin) in neutralem oder schwach alkalischem Bade kräftig gefärbt (ebenso Zellulose[1]). Für Blätter wird nachstehendes Verfahren gegeben: Zentimeterbreite Stücke werden zur Verjagung der Luft einige Min. in Alkohol gekocht und nach dem Erkalten auf einige Zeit in Salpetersäure gebracht, so daß sie völlig von der Säure bedeckt sind; dann werden sie mit Wasser ausgewaschen, zur Vertreibung der Luft mit Alkohol erwärmt und 2—3 mal mit schwachem Ammoniak übergossen, bis das Gewebe farblos und durchsichtig geworden ist. Nun folgt Neutralisation mit 3 % Essigsäure und Färbung mit einem Gemisch von Brillantblau, Anilinblau (oder einem anderen blauen, wasserlöslichen, von trisulfonierten Triphenylrosanilinen abstammenden Farbstoff) und mit Bismarckbraun in 3 % Essigsäure oder in 3 % Ameisensäure (stickstoffhaltige Körper und Kutikula braun, Callose grünblau).

Die Lichtzone.

Die Palisaden vieler Samen (die Zellen der Palisadenschicht, Prismen-, Hartschicht) zeigen dicht (Pisum, Abrus) oder doch nahe der Kutikula (Trigonella, Fig. 125) eine in gleicher Höhe verlaufende Querzone, die das Licht stärker durchläßt und sich scharf von der benachbarten dunkler erscheinenden Membran abhebt. Diese Lichtlinie (besser Lichtzone, Tschirch), die nicht an Querschnitten sichtbar ist (Junovicz)[2], findet sich bei Samen der Legumin., Malvac., Geraniac., Cannac., Tiliac., Sterculiac., Cucurbit., Labiaten, Mimosen, Convolvul., Bixaceen u. a. (Lit. S. $102,_{15}$). Zuweilen sind 2 Lichtzonen vorhanden (Junovicz, Russow). Trotzdem die Lichtzone schon von Malpighi (1675) beobachtet und von Schleiden (1838) abgebildet worden ist, wurde sie

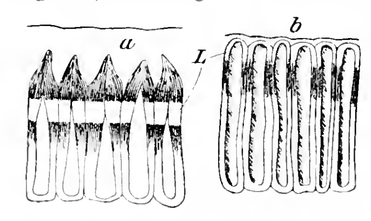


Fig. 125. Lichtzone (*L*) der Samenpalisaden, *a*) von Trigonella foenum graecum, *b*) von Pisum sativum (Tunmann).

[1]) L. Mangin, Sur les réactifs colorants des substances fondamentales de la membrane, Compt. rend., 1890, CXI, 120.

[2]) R. Junovicz, Die Lichtlinien in den Prismenzellen der Samenschalen, Sitzber. Wien. Ak. 1878, LXXVI_1, 335.

noch von Hanstein (1866) völlig verkannt, und auch jetzt sind wir nicht genügend über sie unterrichtet.

Die Lichtzone wurde von Russow[1]) auf physikalische Ursachen zurückgeführt, die Membran sollte dort „dichter, wasserärmer" sein. Nur zum Teil schließen sich ihm hierin Lohde (Lit. S. 102, 14) u. a. an, während Wettstein[2]), Sempolowski[3]), Tschirch (Anat. Atl. S. 208) u. a. einen verschiedenen Wassergehalt verneinen. Nach Junovicz ist die Lichtzone auf eine „für starke Lichtbrechung günstige Molekularzusammensetzung zurückzuführen". Für chemische Ursachen trat Lohde ein (seine Angabe über die Kutikularisierung der Zone ist aber unrichtig). Wahrscheinlich liegen morphologische und chemische Gründe vor.

In anatomisch-physiologischen Arbeiten wird die Lichtzone oft erwähnt, aber nicht näher untersucht. Mehrfach finden sich Hinweise auf Befunde von Pfaefflin[4]). Dieser sagt aber nur, daß sie „besonders deutlich hervortritt, wenn man Schnitte kurze Zeit in Farbstofflösungen legt, wodurch die Lichtlinie sich als ungefärbt von der umgrenzenden gefärbten Partie abhebt". Beweiskräftiger für einen besonderen Chemismus der Lichtzone sind die Reaktionen mit Jodschwefelsäure und Chlorzinkjod, die von Sempolowski, Junovicz, Tschirch u. a. übereinstimmend erhalten wurden. Während die nicht lichtbrechenden Teile sofort blau oder violett werden, bleibt die Lichtzone zunächst ungefärbt, wird dann langsam gelb und bläut sich erst nach längerer Zeit. Sie verschwindet „nach längerem Kochen in Kalilauge" (Sempolowski). Bei der Säurehydrolyse habe ich keine Veränderung bemerkt, so daß ich, da Hemizellulosen nicht vorliegen, einen Gehalt an Pektin oder an calloseartigen Stoffen anzunehmen geneigt bin. Bei Einwirkung starker Reagentien (Salpeter-, Chrom-, Schwefelsäure) wird zuerst die Lichtzone gelöst, der darüberliegende Teil der Prismenzellen hebt sich ab.

Des weiteren ist die Lichtzone „sowohl von der Molekularzusammensetzung, als auch vom anatomischen Bau der Zelle und von der Art der Zellwandverdickung abhängig" (Junovicz) und schon Russow fand, daß die Verdickung der Wand an dieser Stelle zuerst einsetzt (Entstehung stark lichtbrechender Wülste).

---

[1]) E. Russow, Mém. de l'Ac. St. Pétersb., 1873, 7, XIX, S. 33.

[2]) R. v. Wettstein, Verh. zool.-bot. Ges. Wien, 1888, XXXVIII, S. 41.

[3]) A. Sempolowski, Bau d. Samenschale, Diss. Leipzig, S. 11.

[4]) P. Pfaefflin, Entw., Bau u. Funktion d. Nabelspalte usw. praktisch wichtiger Papilionaceen-Samen, Diss. Bern, 1897, S. 35.

Hemizellulosen.

Hemizellulosen sind Polysaccharide, die (im Gegensatz zur Zellulose) sich leicht mit verd. Säuren hydrolysieren lassen und hierbei verschiedene Zucker (Mannose, Galaktose u. a.) liefern (E. Schulze)[1]. Zu den Hemizellulosen gehören Galaktane, Mannane, Arabane, Amyloid[2] (Galaktoaraban), ferner Pentosane, Methylpentosane, Xylane. Während die letztgenannten 3 Gruppen Gerüstsubstanzen darstellen, werden die übrigen in der Membran vielfach als Reservestoffe aufgespeichert und bilden, wahrscheinlich als Mischkohlehydrate, die starken, unverholzten Wände. Die Reservestoff-Hemizellulosen verleihen dem Endosperm die bekannte harte Konsistenz und treten häufig in Gemeinschaft mit Zellulosen auf; teils überwiegen Hemizellulosen, teils Zellulosen. Wir finden sie in Samen (Gramin., Palmen, Liliac., Oleaceen, Loganiac., Papilionac., Plantag. u. a.), in den sekundären Membranen mechanischer Elemente, des Leptoms und Parenchyms. Die innere Verdickungsschicht der Fasern (die Gallert- oder Knorpelschicht Sanios, Lit. S. 38,1) besteht bei unseren Sträuchern und Bäumen meist aus Hemizellulosen (Leguminos., Gnetac., Sterculiac., Urticae., Dipterocarp., Thymelac., Tiliac. u. a., Aisslinger, Lit. S. 540, 5), ebenso im Leptom und im Grundparenchym vieler Knospen (Schaar)[3], selbst im Wurzelstock (Plantago alpina u. montana, Schellenberg)[4].

Die in den Membranen aufgespeicherten Hemizellulosen werden im Herbste aus Amylum gebildet (A. Fischer, Lit. S. 184, 2), die der Samen aus zugeführten Hexosen. In den vegetativen Teilen kann die Hemizellulose nur in jenen Zellen gelöst und nutzbar gemacht werden, die noch einen lebenstätigen Plasmakörper besitzen. Die Lösung geschieht auf enzymatischem Wege. Im Libriform wurde Auflösung von Hemizellulosen beobachtet in Weidenstecklingen (Leclerc du Sablon[5]), bei Vitis vinifera und Robinia, nicht aber bei Fagus, Quercus, Fraxinus, Corylus, Alnus, Schellenberg), ferner im Gewebe der Knospen bei Fraxinus excelsior (Schaar), Betula, Alnus, Aesculus, Corylus (Schellenberg). In den Bastfasern sind sie meist Baustoffe (Tilia),

[1] E. Schulze in zahlreichen Arbeiten seit 1889 in Ber. chem. Ges., Ztschr. phys. Chem. u. Ber. bot. Ges. Pilze und Bakterien lösen ebenfalls die Hemizellulosen auf, M. C. Potter, On the Occurrence of Cellulose in the Xylem of Woody Stems, Ann. of Bot., 1904.

[2] J. M. Schleiden, Über das Amyloid, eine neue Pflanzensubstanz, Beitr. z. Bot., 1844. Von Reiss wurde noch die Zugehörigkeit des Amyloids zu den Hemizellulosen verneint (Landw. Jahrb., 1889, XVIII, S. 711).

[3] F. Schaar, Reservestoffbehälter der Knospen von Fraxinus excelsior L., Sitzb. Wien. Ak., 1890, $XCIX_1$, Sep.

[4] H. C. Schellenberg, Über Hemizellulosen als Reservestoffe bei unseren Waldbäumen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 36.

[5] Leclerc du Sablon, Rech. phys. sur les matières de réserve des arbres, Rev. gén. de Bot. 1904 u. Compt. rend. 1898, CXXVII, 968.

bei Ficus coronata Reservestoffe (Aisslinger). Bei der Keimung der Samen wird im Endosperm oft die gesamte Membran durch Oxydasen gelöst, während im Keimling nur die Verdickungsschichten abschmelzen.

Ist schon in makrochemischer Hinsicht unsere Kenntnis der Hemizellulosen noch unzureichend, so sind wir in der Mikrochemie nur auf wenige Reaktionen angewiesen. Reiss gab noch an, daß die von ihm aus Phoenix dactylifera, Phytelephas und anderen Samen isolierten Reservezellulosen sich mikrochemisch nicht von Zellulose unterscheiden lassen. Wir bezeichnen derzeit alle nicht verkorkten und nicht verholzten Membranen, die sich durch Kochen mit verd. Säuren hydrolysieren lassen, als Hemizellulosen (s. unt.). Konzentration der Säure und Dauer der Einwirkung muß von Fall zu Fall erprobt werden. Meist genügt ein $^1/_2$—1stündiges Kochen mit 5 % Salzsäure oder ein $2^1/_2$stündiges Kochen mit $2^1/_2$ % Schwefelsäure. Grüss (Lit. S. 427, 1) hydrolysiert (Libriform der Amygdalaceen) durch 12stündiges (und längeres) Kochen bei nur 70—75° in einem mit dem Rückflußkühler versehenen Kolben mit verd. Schwefelsäure (1.5 ccm Säure, 100 ccm Wasser). Auch geeignete Enzyme kann man benutzen, so löst die im Kirschgummi enthaltene Cytase (S. 427) das Galaktan des Libriforms der Amygdalaceen. Durch Prüfen der Kochflüssigkeit mit Fehling kann festgestellt werden, daß beim Kochen mit der verd. Säure die Hemizellulosen in Zucker übergeführt wurden. Zu diesem Zwecke müssen aber aus den Präparaten vor der Hydrolyse die Zellinhalte entfernt werden. Vorteilhaft wählt man stärke- und glykosidfreie Gewebe oder man trennt auf mechanischem Wege die betreffenden Elemente ab, was bei Fasern ausführbar ist. Bei Samen genügt in vielen Fällen (Strychnos) zur Hydrolyse ein kürzeres Aufkochen (3—5 Min.) in verd. Säure unter Deckglas.

Nach dem Kochen und dem Auswaschen der Präparate wird die Wirkung der Hydrolyse festgestellt. Die Membranen sind teils abgeschmolzen, teils zeigen sie Risse und Sprünge. Bei starker Hydrolyse erfolgt auch ein körniger Zerfall. Bei anderen Objekten erscheinen die Membranen in ihrer ursprünglichen Stärke, besonders wenn die Hemizellulosen mit Zellulose oder mit „Holz“ verestert sind. Bei Heranziehung von Vergleichspräparaten findet man dann oft, daß die Membran hyalin und ihr Lichtbrechungsvermögen ein anderes geworden ist. Die durch die Hydrolyse bewirkten Veränderungen gleichen denen, die in der Pflanze durch Enzyme bei der Mobilmachung der Reservestoffe stattfinden. Doch muß in allen Fällen die Herauslösung der Hemizellulose durch mikrochemische Reagentien festgestellt werden. Optische Betrachtung und Messen der Wandstärke allein können nicht immer einen sicheren Aufschluß geben.

Die Membranen werden vor und nach der Hydrolyse mit Jodreagentien, Kupferoxydammoniak und mit Farbstoffen geprüft. Da verschiedene Hemizellulosen vorliegen, so werden die Reaktionen verschieden ausfallen. Einige werden von Jodjodkalium oder Chlorzinkjod gefärbt (selbst vor der Hydrolyse), andere wiederum nicht. Seit langem bekannt ist die Blaufärbung des Amyloids sowie der Galaktane und Mannane mit Jodreagentien. Die Jodreaktionen hängen nicht nur von der Beschaffenheit der Membran, sondern auch von der der Reagentien ab. Oft reagieren die Membranen erst nach längerer Einwirkung (mehrere Tage). Auch das Alter der Reagentien ist von Einfluß (ihr Gehalt an Jodwasserstoffsäure). Im allgemeinen färbt eine mehrere Jahre alte Chlorzinkjodlösung (mit überschüssigem Jod) stärker und schneller als eine frisch bereitete Lösung. Nicht mit Chlorzinkjod reagiert die Hemizellulose im Samen von Plantago. Nach Schellenberg (Lit. S. 486, 1) besteht die Membran im Plantago-Samen aus $^{2}/_{3}$ Hemizellulose und $^{1}/_{3}$ Zellulose. Wahrscheinlich liegt eine esterartige Bindung beider Körper vor. Die Membran nimmt während der Keimung an Stärke nicht ab, verliert jedoch ihr Lichtbrechungsvermögen und ändert ihr reaktionelles Verhalten. Im ruhenden Samen wird die Membran von Jodlösung nicht, von Chlorzinkjod nur sehr schwach violett gefärbt. Während der Keimung werden die Hemizellulosen gelöst und die Chlorzinkjodreaktion tritt nun um so schärfer ein, je mehr Hemizellulosen herausgelöst wurden. Den gleichen Effekt erzielt man durch Kochen mit 5 % Salzsäure. Die in den Fasern von Daphne pendula mit Holzsubstanz veresterte Hemizellulose färbt sich mit Chlorzinkjod (Aisslinger). Die Fasern geben mit Chlorzinkjod eine rotviolette Färbung und gleichzeitig schwache Verholzungsreaktion. Nach dem Kochen mit der Säure gibt Chlorzinkjod nur Gelbfärbung, die Phloroglucinreaktion tritt schärfer ein. Ein gleiches Verhalten zeigt die Jutefaser. Die Haare, welche die verkümmerten Samen von Musa einschließen, färben sich nur schwach mit Chlorzinkjod, kräftig mit verd. und starker Jodjodkaliumlösung. Nach der Hydrolyse färbt Jod schwach blau, Chlorzinkjod schwach rötlich (Jähkel[1])). Die Reservezellulose der Kerne der Dattel besteht vorzugsweise aus Galaktomannan; dieses wird von Chlorzinkjod blauviolett, von Jodphosphorsäure gelb, von Kongorot hellrot gefärbt. Ein gleichzeitig auftretendes β-Mannan bleibt in Chlorzinkjod farblos. Die Galaktan-Natur der Libriformverdickungen der Prunaceen kann durch Bildung von Schleimsäure ermittelt werden. „Die dünnen Späne wurden mit Wasser, Alkohol

[1]) P. Jähkel, Über Anatomie u. Mikrochemie der Bananenfrucht und ihre Reifungserscheinungen, Kieler Dissert., 1909, S. 23.

und Äther gereinigt, mit der zwölffachen Menge Salpetersäure (spez. Gew. 1,15) erhitzt und auf ein Drittel des Volumens eingedampft. Nach 24 Stunden fielen aus der filtrierten Lösung die charakteristischen Kristalle von Schleimsäure nieder" (Grüss, Bot. Centrbl., 1887, LXX, 242).

Kupferoxydammoniak wirkt verschieden, Araban und Xylan wird gelöst, meist auch Amyloid. Über die Aufnahme von Farbstoffen liegen Erfahrungen von Grüss (Bibl. bot., 1896 Heft 49) vor. Heinricher (Lit. S. 552, 3) fand, daß amyloidhaltige Membranen (Samen von Impatiens), die sich nicht mit Chlorzinkjod färbten, Kongorot aus wässeriger Lösung speicherten. Hingegen widerstehen viele Hemizellulosen nicht heißem Glyzerin bei 300° (eine Ausnahme bildet Amyloid, van Wisselingh, Lit. S. 552, 1).

Lichenin.

Lichenin (Flechtenstärke) wurde von Berzelius der gallertbildende Stoff von Cetraria islandica genannt. Lichenin besteht aus 2 isomeren Körpern $(C_6H_{10}O_5)n$, von denen der eine sich mit kaltem Wasser ausziehen läßt und sich mit Jod bläut (Dextro- oder Isolichenin), während der andere, nicht mit Jod reagierende erst mit heißem Wasser ausziehbar ist[1].

Zum Nachweis von Lichenin dienen Jodjodkalium und Rutheniumrot. Nach Tschirch[2]) findet sich Lichenin nur in der Membran und zwar vorzugsweise in der Mittelschicht. Diese „ist es in erster Linie, die sich mit Jod direkt blau färbt und beim Kochen mit Wasser sich löst bzw. in eine Gallerte übergeführt wird. Die Färbung mit Jod, die stets nur an den Wänden auftritt, bleibt auch bei alter Droge nur selten aus, wenn man den Schnitt in Jod-Jodkaliumlösung einlegt und dann mit Wasser auswäscht". Anderseits tritt nach Knop und Schnedermann (Lib. Ann. 1845) die Licheninreaktion auch im Inhalt und zwischen den Hyphen ein und in neuerer Zeit hat Tobler (Lit. S. 201, 3) die Reaktion zwar auch zunächst in der Mittelschicht beobachtet, doch „wurde zuerst der Inhalt der Zellen blau", später bläuten sich die Zellwände des ganzen Thallus mit Ausnahme der Gonidienschicht und der alleräußersten Schichten. Um den Eintritt der Jodreaktion zu beschleunigen, setzt man dem mit alkoholischer Jodlösung behandelten Schnitte Milchsäure zu. Derart hergestellte Präparate behalten die Färbung bis 6 Monate[3]). Rutheniumrot gibt Rotfärbung in

[1]) Th. Berg, Z. Kenntn. d. in Cetraria islandica vork. Lichenins u. jodbläuenden Stoffes, Dorpater Diss., 1872 u.: Pharm. Ztschr. f. Rußland, 1873, XII, S. 129.

[2]) A. Tschirch, Handb. d. Pharmakogn., 1912, II, S. 266.

[3]) F. Tobler, Mitt. üb. Verw. v. Milchsäure zur Beschleunigung u. Verbesserung gewisser Jodreakt., Ztschr. f. wiss. Mikr., 1910, XXVII, S. 366.

den Präparaten und färbt auch sofort den isolierten Körper (Isolichenin, Zopf) rot. Lichenin quillt in Wasser und löst sich leicht in Kupferoxydammoniak und in Alkalien.

Pektinmembranen.

Die bei der Zellteilung entstehende Zellplatte (S. 539) spaltet sich in 2 Lamellen, zwischen denen die sog. Mittellamelle zur Ausbildung gelangt (Treub, 1878, Strasburger, 1898 u. a.). Die Mittellamelle (primäre Membran) verbindet (verkittet) die benachbarten Zellen; sie wurde daher von Mohl (Üb. d. Verb. d. Zellen untereinander, Diss., 1835) Interzellularsubstanz genannt. Diese Mittellamelle ist in vielen Fällen in steter Veränderung begriffen[1]). Bei der Bildung der Interzellularen spaltet sie sich und überzieht die Interzellularräume als sog. Auskleidungen (S. 440). Da die Mittellamelle ein Produkt zweier Lamellen ist, so ist ihre Spaltung erklärlich. Größere Gewebelücken entstehen durch Auflösung der Mittellamelle und viele Schleime verdanken ihr ihre Entstehung. Ebenso geht die resinogene Schicht bestimmter Sekretbehälter und die melanogene Schicht aus der Mittellamelle hervor. Auch dort, wo die Zellen in innigem Verbande verbleiben, läßt sich vielfach eine Veränderung der Mittellamelle feststellen (sie verkorkt im Kork, Tilia), die sich mikrochemisch nur dadurch ermitteln läßt, daß die für die Mittellamelle eigenen Reaktionen nicht mehr eintreten (Sklerenchym, Pteris, Tilia).

Seit Mulder (1838) wurden die Mittellamellen und ihre Umwandlungsprodukte in Beziehung zu den von Payen aufgefundenen Pektinen gebracht. Die Pektine führen neben Pentosen und Hexosen wahrscheinlich noch Glykonsäuren im Molekül, stehen den Kohlehydraten zwar sehr nahe, geben aber im Gegensatz zu diesen mit Salpetersäure nicht Oxal-, sondern Schleimsäure. Die nähere Kenntnis der Pektine ist noch mangelhaft, zumal den makrochemischen Analysen offenbar nicht immer nur Produkte der Mittellamelle, sondern auch solche der sekundären Membran, selbst Zellinhalte, zugrunde liegen. Nach Mangin soll in der jugendlichen Zellwand Zellulose und Pektose vorliegen. Die Pektose löst sich in Kupferoxydammoniak erst nach Vorbehandlung mit verd. Alkalien oder verd. Salzsäure. Sie geht bei weiterem Wachstum der Membran in Pektinsäure über, die als Kalziumpektat die Mittellamelle der Gewebe bildet. Die sekundäre Membran soll aus Zellulose und Pektinen bestehen, die tertiäre Membran Zellulose sein. Von anderer Seite (s. unt.) wird Pektose als Bestandteil der Mittellamelle angenommen. Nach Allen liegen die Pektine in reinster Form in kräftig wachsenden Zellen und in jugendlichen Holzmembranen vor. Schroeder stellt die Pektine zu den Mucinen.

[1]) Ch. E. Allen, On the origin and nature of the middle lamella, Bot. Gazette, 1901, XXXII, S. 1.

Mucorarten lösen die Mittellamelle, daher vertritt Schellenberg[1]) die Ansicht, daß sie zum größten Teile aus Hemizellulosen besteht.

Viele Pektine gehen, wie die Entwicklungsgeschichte lehrt, aus der Membran hervor, doch verneint Pfeffer, daß sie sämtlich durch Metamorphose der Zellwand entstehen (Pflanzenphys., 1901, I, S. 476). Tschirch[2]) verlegt ihre Bildung ausschließlich in die Mittellamelle.

Im polarisiertem Lichte tritt die Mittellamelle deutlich hervor; sie zeigt bei gekreuzten Nicols drei scharf getrennte Lamellen, die mittlere erscheint dunkel, die beiden äußeren, den Zellwänden anliegenden, sind hell (Dippel, Lit. S. 39, 5). Die Mikrochemie der Mittellamelle und ihrer Umwandlungsprodukte ist gegenwärtig noch überwiegend auf Färbungen beschränkt.

Rutheniumrot wird vielfach benutzt (wässer. Lösung, 1 : 5000 bis 10000, bei Lichtschutz haltbar [es löst sich auch in Alaun- und Chlorkalziumlösung, nicht in Alkohol, Glyzerin, Nelkenöl]). Ein Spezialreagens, das nur Pektine färbt, ist es nicht. Von den Inhaltsstoffen werden stickstoffhaltige Substanzen mitgefärbt. Körnerplasma, Chromatin, Zellkern färben sich (namentlich nach Vorbehandlung mit Alaun, Säurealkohol u. a.), dann Volutin (A. Meyer, S. 423, 4), Glykogen und Isolichenin (Tobler, Lit. S. 201, 3). Mehr ins Gewicht fällt, daß auch weitere Membranen höherer Pflanzen den Farbstoff speichern. Bei Gegenwart von Alkalien werden verholzte Wände mehr oder weniger rötlich gefärbt. Doch bietet Rutheniumrot bei kritischer Benutzung mannigfache Vorteile. Die Färbungen halten sich in Kanadabalsam und in Glyzeringelatine (im Gegensatz zu den übrigen Pektinfärbungen). In der Wirkung schließt es sich den basischen Farbstoffen an, die mit Zellulose und Callose nicht reagieren. Nach Mangin[3]) färben sich die Pektine der Mittellamelle, sowie alle aus den Pektinen hervorgegangenen Körper (Pektinschleime und -gummi), so daß sich die Reaktion bei entwicklungsgeschichtlichen Studien als wertvoll erweist. Als geeignetes Versuchsobjekt empfiehlt Chalon (Lit. S. 553, 1) Kiefernholz (mindestens 3jährig), das zuvor 24 Std. in Salzsäure-Alkohol (1 + 3) und ebensolange in Ammoniak gelegen hat.

Dem Rutheniumrot schließen sich als Pektinfarbstoffe im Manginschen Sinne[4]) Safranin, Methylenblau, Naphthylenblau R an.

[1]) H. C. Schellenberg, Unters. üb. d. Verhalten einig. Pilze gegen Hemizellulosen, Flora, 1908, XCVIII, S. 257.

[2]) A. Tschirch, Über Pektin und Protopektin, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1907, XVII, S. 237.

[3]) L. Mangin, Sur l'emploi du rouge de ruthénium en anatomie végétale, Compt. rend., 1893, CXVI, S. 653.

[4]) L. Mangin, S. l. présence d. composés pectiques d. l. végétaux, Compt.

Diese Färbungen sind nicht haltbar (nur in 2 % Borsäure einige Monate, Deckglasumrandung mit Vaselin-Paraffin). Zarte Schnitte gelangen entweder direkt in die Farblösungen oder sie werden zuvor einige Zeit mit Eau de Javelle behandelt, gut mit Wasser ausgewaschen und sodann mit 1,5 % Essigsäure neutralisiert. Safranin färbt Pektinsubstanzen orangegelb (Kork und Holz kirschrot), Methylenblau violett (andere Zellbestandteile rein blau). Die Pektinfärbungen verschwinden beim Auswaschen mit schwach verd. Essigsäure oder Milchsäure, die übrigen Färbungen bleiben erhalten. Doppelfärbungen erhält man mit Naphthylenblau R und Säuregrün JEEE (in 100 g Wasser je 1 g von den beiden Farbstoffen). Plasma, Kork, Holz grün, Pektine violett. Naphthylenblau kann durch Neutralrot ersetzt werden. Nach Chalon werden Pektine außerdem noch von Hämatoxylin, Magdalarot, Corallin und Kongorot gefärbt.

Daß die angeführten Färbungen den Pektinen zukommen, läßt sich dadurch beweisen, daß aus den Schnitten entweder die Pektinstoffe oder die Zellulosen entfernt werden. Zu Entfernung der Zellulose werden zartere Schnitte 3 bis 4 Tage lang in einem niedrigen, gut verschlossenen Schälchen mit frischem Kupferoxydammoniak mazeriert, die Lösung wird einigemale erneuert. Bei verholzten Geweben muß die Mazeration bis mehrere Wochen dauern. Ist die Zellulose herausgelöst, dann wird die Lösung vorsichtig abgegossen, das Präparatenglas nebst den Präparaten in eine größere Porzellanschale gestellt und mit Wasser aufgefüllt. Die Schnitte lassen sich nun, ohne daß man sie zu berühren braucht, ins Wasser überführen, das einigemale erneuert und schließlich durch 3—5 % Essigsäure ersetzt wird. In den vorsichtig auf den Objektträger gebrachten Schnitten tritt nach Befeuchten mit Jodlösung weder bei Zusatz von Phosphorsäure noch von Chlorzink die Zellulosereaktion ein; hingegen erhält man die oben genannten Pektinfärbungen. Nach Mangin werden die Pektine durch Kupferoxydammoniak[1]) in Pektinsäure übergeführt, die sich in Ammonoxalat und in verd. Ammoniak vollständig auflöst. Zum Gegenbeweis lassen sich die Pektine entfernen, so daß nur die Zelluloseanteile in den Schnitten zurückbleiben. Zu diesem Nachweise werden die Schnitte in 2 % Salzsäure 1/2 Std. lang gekocht, gut mit Wasser ausgewaschen, dann in 2 % Kalilauge oder Ammoniak gekocht und nochmals gründ-

rend., 1889, CIX, 579 und: Propriétés et réactions d. comp. pectiques, Journ. de Bot., 1892, VI, S. 206, 235, 363; Bull. Soc. Bot. d. France, 1894, XLI, S. 40.

[1]) Nach Kabsch sollte Kupferoxydammoniak ein Reagens auf Pektose sein, die dadurch in pektinsaures Kupfer übergeführt würde, Jahrb. f. wiss. Bot 1863, III, S. 357.

lich ausgewaschen. Es ist empfehlenswert, die ganze Prozedur in einer Porzellanschale vorzunehmen, so daß ein Übertragen der Schnitte mit Nadeln fortfällt, aus Reagenzgläsern lassen sich die Schnitte nicht so leicht entfernen. Die zurückbleibenden Wände geben jetzt Zellulosereaktionen, färben sich aber nicht mit Pektinfarbstoffen.

Das Pektin der Mittellamelle soll pektinsaurer Kalk sein, weil, wie Mangin meint, zur Lösung Salzsäure nötig sei. Zur Isolierung der Zellen werden kleine Gewebestücke in Salzsäurealkohol (1 konz. Salzsäure + 3 Alkohol) mazeriert. Dadurch wird die Pektinsäure in Freiheit gesetzt. Die überschüssige Salzsäure und das gebildete Chlorkalzium werden mit Wasser entfernt. Die Pektinsäure ist unlöslich in Wasser und bleibt im Gewebe, die Zellen noch zusammenhaltend. Erst bei Zusatz von verd. Kalilauge, Natronlauge, Ammoniak oder von schwachen Lösungen von Alkalikarbonaten oder -phosphaten erfolgt Lösung der Pektinsäure und die einzelnen Zellen werden durch leichten Druck isoliert. Für die Anwesenheit von Pektinsäuren spricht ferner der Befund, daß die mit Salzsäurealkohol behandelten, gut ausgewaschenen Schnitte nicht zerfallen, wenn man sie in Kalk- oder Barytwasser taucht, da alsdann unlösliche pektinsaure Kalk- oder Barytsalze entstehen, die die Zellen von neuem zusammenkitten[1]). Will man die Pektinsäure zur Anschauung bringen, dann muß man die mit Salzsäurealkohol mazerierten Schnitte nach dem Auswaschen mit Wasser färben (Phenosafranin, Methylenblau). Die Pektinsäure erscheint stark gefärbt zwischen den Zellen als dünne Lamelle, während sie an den Interzellularen punkt- und knopfförmige, regellos angeordnete Verdickungen bildet (Blätter von Iris, Helleborus niger, Yucca).

Wille[2]) tritt ebenfalls für Kalkpektat ein, da die Mittellamelle der Laminarien sich nach Vorbehandlung mit verd. Salzsäure in Natriumkarbonat auflöst. Bekannt ist das Auftreten von Kalzium in der Mittellamelle, doch fehlt der Beweis, daß das Kalzium an Pektinsäure gebunden ist, daß überhaupt Pektinsäure vorliegt. Gegen Pektinsäure sprechen die Erfahrungen bei der Mazeration (mit Ammoniak und anderen Alkalien, S. 39). Zudem soll sich nach Devaux[3]) die Mittellamelle in alkoholischer Salzsäure (1. Säure, 4. Alkohol)[4]) allein lösen. Dies dürfte, wenn ein Kalziumpektat vorläge, nicht eintreten, denn durch

---

[1]) L. Mangin, Substance intercell., Compt. rend., 1890, CX, S. 295.

[2]) N. Wille, Physiol. Anat. d. Laminar., Christiania 1897.

[3]) H. Devaux, Structure de la lamelle moyenne dans les tissus mous, Mém. Soc. de Bordeaux, 1903, III, S. 89.

[4]) Die Schnitte werden 20 Min. mit der Säure mazeriert, dann aufgekocht (5—10 Min., die Zeit ist bei den verschiedenen Pflanzen erst auszuprobieren), mit Alkohol abgewaschen und in Wasser gelegt.

die Salzsäure würde das Kalziumpektat in Chlorkalzium und Pektinsäure zerlegt werden und die Pektinsäure ist in Wasser fast unlöslich. Nimmt man jedoch Pektose an, so würde sich der Zerfall der Schnitte nach der Behandlung mit alkoholischer Salzsäure erklären lassen. Durch die Säure wird Pektose in Pektin übergeführt und dieses ist in Wasser leicht löslich. Devaux findet ferner, daß Schnitte, die mit alkoholischer Salzsäure behandelt waren, vor dem Zerfall durch Eintragen in Alkalien bewahrt werden. Durch die Säure wird Pektose in Pektin verwandelt und letzteres durch Alkalien in Pektinsäure übergeführt, die in Wasser unlöslich ist, so daß die Schnitte nicht zerfallen.

Es bleibt somit strittig, ob Pektinsäure oder Pektose in der Mittellamelle vorliegt.

Die Fähigkeit der Membran Metalle zu speichern kommt nach Devaux[1]) den Pektinen zu. Die Schnitte kommen auf einige Augenblicke in Eisensulfat und werden mit destilliertem, dann mit, durch Essigsäure schwach angesäuertem Wasser ausgewaschen; sie färben sich nach Einwirkung von Ferrocyankalium blau. Die Blaufärbung, die sich durch Salzsäure verstärken läßt, hält sich in Gelatine und in Kanadabalsam. Zarte Membranen färben sich am stärksten. Schnitte, aus denen die Pektine zuvor entfernt wurden, färben sich nicht, Holzmembranen bleiben nach Vorbehandlung mit stark verd. Säuren farblos.

Die Zugehörigkeit der Pektine zu den tierischen Mucinen (S. 564) begründet Schroeder[2]) mit den Angaben von Ishii[3]). Dieser hat aus Dioscorea japonica und batatas einen Körper isoliert, der mit dem tierischen Mucin übereinstimmen soll. Beide Substanzen geben Biuret-, Xanthoprotein- und die Millonsche Reaktion. Beiden gemeinsam ist ihre Unlöslichkeit oder doch hohe Resistenz gegenüber Säuren, ihre Löslichkeit in verd. Alkalien, ihre Fällbarkeit durch gewisse Körper. „Auf Essigsäurezusatz zur alkalischen Lösung der Mucine erfolgt in gleicher Weise wie bei den Pektinen ein Niederschlag in Form einer schleimig zähen Masse. Auch das Mucin wird wie das Pektin von Alkohol bei Gegenwart einer hinreichenden Menge von Neutralsalzen gefällt. Pektoseschleime gerinnen durch Bleiazetat und Sublimat. Mucine werden gefällt."

[1]) M. Devaux, Sur les réactifs colorants des substances pectiques. — Sur la coloration des composés pectiques, Procès-verb. de la Soc. Linnéenne de Bordeaux 1901.

[2]) B. Schroeder, Chem. Verwandtschaft der tierischen Mucine mit den pflanzl. Pektinen, Bot. Centrlbl., Beih., 1901, X, S. 122.

[3]) Ishii, Imp. Un. Coll. Agric. Bull., 1894, II, S. 97. Mucin wird auch für die Aleuronkörner von Fraxinus angegeben (Lit. S. 490,3).

Die **Pektine der Früchte.** die zur Auflockerung der Gewebe, zur Isolierung der Samen dienen, sind nach Tschirch (Lit. S. 563, 2) ausschließlich Produkte der Mittellamelle und lösen sich in konz. Rohrzuckerlösung. Zuckerlösung läßt sich somit zur Unterscheidung der unveränderten Mittellamelle von der in Pektinmetamorphose begriffenen benutzen. Mangin[1]) gebrauchte 1893 Zuckerlösung, um gehärtete Pektinschleime zur schnelleren Quellung und Lösung zu bringen. Rosenberg[2]) benutzte bei einigen Früchten 35—65 % Rohrzuckerlösungen, in welchen er die Schnitte frischen Materials aufkochte und zwar nicht unter Deckglas, sondern „es ist Bedingung, die Präparate mit einer großen Menge Zuckerlösung längere Zeit im Reagenzglase zu kochen". Die Versuche sind nicht einwandfrei. Bei den Pektinen der Umbelliferenwurzeln hat Tunmann[3]) folgenden Weg eingeschlagen: Behandlung der Schnitte mit Methylenblau-Zuckerlösung in der Kälte und Feststellung der Quellung. Auch hiergegen lassen sich Einwände erheben; daher wurde stets „ein Vergleichspräparat vor der Behandlung mit Zuckerlösung erst mit Bleiazetat gehärtet". Bei der Nachprüfung hielten diese Angaben einer Kritik nicht stand. Kocht man nämlich Schnitte (Pirus malus, Ribes rubrum u. a.) mit Wasser allein, so erhält man die gleichen Bilder wie mit Zuckerlösung. Wie es scheint, erfolgt die Lösung nicht durch das Wasser allein, sondern durch die im Gewebe befindlichen Säuren, an denen gerade Früchte bekanntlich sehr reich sind. Der Makrochemie zufolge sind übrigens viele Fruchtpektine mehr oder weniger leicht und vollständig in Wasser löslich. Ohne den Wert der Zuckerreaktion in Frage zu stellen, erscheint es doch unbedingt erforderlich, die Pektine in den Schnitten zu härten und die gehärteten Schnitte von den Säuren durch Wässern zu befreien und zwar vor der Zuckerreaktion, die unter Deckglas unter ständiger mikroskopischer Kontrolle auszuführen ist. Hällström (Lit. S. 381, 3) hat die Pektinmembranen von Tamarindus indica (reife Frucht) mit Zuckerlösung nicht zur Lösung bringen können. — Um die Pektinbildung entwicklungsgeschichtlich zu verfolgen, wird man bei Früchten verschiedene Reifestadien konservieren müssen: in Betracht kommen Alkoholdampf, verd. Alkohol, 1—3 % Formol (aber nicht 0,1 % Formol [Rosenberg], in dem Früchte bald faulen); systematische Untersuchungen hierüber liegen nicht vor.

Färbungen führen bei der Unterscheidung der unveränderten und

[1]) L. Mangin, Bull. d. l. soc. bot. d. France, 1893, XL, S. 119.

[2]) E. Rosenberg, Über die Pektinmetamorphose, Berner Diss., 1908, S. 23.

[3]) O. Tunmann, Bildung d. Luftlücken b. Wurzeln d. Umbelliferen, Pharm. Zentrlh., 1907, XLVIII, S. 885.

der in Pektinmetamorphose begriffenen Mittellamelle nicht zum Ziel, da beide mit gleicher Stärke Farbstoffe speichern. Die Pektine der Früchte färben sich ebenfalls mit allen Pektinfarbstoffen. Einen Fall, bei dem die Pektinbildung aus der Mittellamelle ohne weiteres aus der mikroskopischen Betrachtung hervorgeht (Verdickung und Verquellung), hat Tschirch (Anat. Atlas, S. 45) bei Sambucus nigra gefunden. Im allgemeinen bleibt aber nach meinen Befunden die Mittellamelle (P. malus, P. cydonia) bis zur Auflösung ungemein zart. Ähnliche Ergebnisse erhielt Jähkel (S. 39 der S. 562,1 ang. Diss.) bei Banane und Mispel: „da alle Zellen in den reifen Früchten locker nebeneinander liegen, läßt sich vermuten, daß die Mittellamellen der einzelnen Zellen irgendwie aufgelöst werden. Die Zellwände sind aber so dünn, daß eine Mittellamelle auch in unreifen Früchten nicht sicher zu erkennen ist. Als Färbemittel wurden Methylenblau und Rutheniumrot benutzt. Sowohl in harten wie in weichen Früchten färbten sich die Zellwände völlig gleichmäßig. In reifen weichen Früchten erscheinen höchstens die Wände nach innen (!) minder scharf begrenzt als bei unreifen".

Der Trichomdeckel der Saugschuppen der Tillandsien besteht aus einem Zellulosegerüst mit reichlichen Pektinmassen, die nach Mez (Phys. Bromeliaceen-Stud., Jahrb. f. wiss. Bot. 1904, XL, S. 157) die Quellung bewirken. Chlorzinkjod färbt den Deckel, der sich nicht in Kupferoxydammoniak löst, schwach gelblich, Phloroglucinsalzsäure grünlichgelb; auch Rutheniumrot und Methylenblau färben ihn intensiv. Nach Vorbehandlung mit 5% Salzsäure und Kalilauge ruft Chlorzinkjod violette Färbung hervor.

Über Pektinschleime s. Schleime.

Die resinogene Schicht.

Das harzig-ölige Sekret sämtlicher Sekretbehälter und Drüsen entsteht nach Tschirch (Harze und Harzbehälter) in einer zu den Membranen der Sezernierungszellen gehörigen resinogenen Schicht. Eine Mitwirkung von Plasma bei der Sekretbildung ist ausgeschlossen (s. interzell. Plasma, S. 440 u. Plasmodesm., S. 522). Die mikroskopische Betrachtung zeigt, daß die resinogene Schicht der schizogenen Gänge und der sog. Zwischenwanddrüsen in Beziehung zu der Mittellamelle steht. Bei den Epidermaldrüsen und den Drüsenflecken wird die Schicht aus der unter der Kutikula gelegenen Lamelle der äußeren Drüsenwand hervorgehen. Die Ölzellen zeigen auch hier eine Abweichung (s. S. 220 ob.), da bei ihnen die Schicht der inneren Zelluloselamelle der Zelle aufgelagert sein muß.

Tschirch und Bécheraz[1]) studierten die Schicht der schizogenen Gänge, bei denen die Verhältnisse am deutlichsten zutage treten. Das Material wurde allmählich bis auf 100° im Trocken-

[1]) A. Bécheraz, Sekretbild. i. d. schiz. Gängen, Diss. Bern., 1893, S. 16 u. A. Tschirch, Harze u. Harzbeh. 1906.

schranke getrocknet. Aus dem Trockenmaterial wurden Schnitte hergestellt und das harzige Sekret durch Alkohol steigender Konzentration gelöst. Die resinogene Schicht tritt hervor, ihr sind Körnchen aufgelagert; sie ist nach innen von einer Haut („innere Haut") abgegrenzt. Die Schicht wird mit Jodreagentien und Eisenchlorid gelb, quillt in Kalilauge, reagiert nicht mit Millon, löst sich nicht in Schwefelsäure und in Salzsäure, ist aber beim Erwärmen in Kaliumchlorat-Salpetersäure löslich, wobei „Körnchen und Leisten" unverändert zurückbleiben. Farbenreaktionen wurden nicht erhalten. Der inneren Haut und der Schicht muß „jedenfalls die reine Zellulosenatur abgesprochen werden". Später erhielt Tunmann[1]) aber Färbungen und zwar nur mit Pektinfarbstoffen, wodurch im Verein mit den Jodreaktionen die chemischen Beziehungen der Schicht der Gänge mit der Mittellamelle sichergestellt wurden. Gute Färbungen gaben Rutheniumrot sowie Bismarckbraun, Naphthylenblau, Safranin und Methylenblau in konz. Rohrzuckerlösung. Die Färbungen mit den Rohrzuckerlösungen konnten Rosenthaler und Stadler[2]) bestätigen.

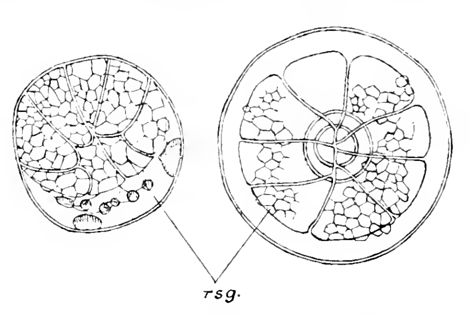


Fig. 126. Labiatendrüsen, Trockenmaterial mit alkohol. Chloralhydrat behandelt. Der Schleim (rsg. = resinog. Schicht) hat sich in Netzstruktur (Kunstprodukt) ausgeschieden (Tunmann).

Bei den Epidermaldrüsen und den Drüsenflächen ist die resinogene Schicht im allgemeinen schwerer sichtbar zu machen. Tschirch beobachtete sie bei Mentha „in Gestalt eines der Kutikula anliegenden Netzes" (Anat. Atl. S. 74) und Mitlacher (Ztschr. öst. Ap. Ver., 1908, LII, Nr. 1) fand sie derart bei getrocknetem Material nach vorsichtiger Behandlung mit Alkohol (unter Deckglas). Auch durch alkoholisches Chloralhydrat läßt sich die Schicht in dieser Form, die Tunmann (Lit. S. 34, 1) als Vakuolentyp bezeichnete, sichtbar machen (Fig. 126). Die im folgenden mitgeteilten Nachprüfungen zeigen aber, daß diese Vakuolenform ein Kunstprodukt ist und in Parallele gestellt werden muß mit jenen Schaumstrukturen, die Longo bei Schleimen (s. d.), Boresch bei Gummi (s. d.), Molisch bei Milch-

[1]) O. Tunmann, Über d. resin. Schicht. d. Sekretb. d. Umbelliferen, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1907, XVII, S. 456.

[2]) L. Rosenthaler u. P. Stadler, Ein Beitr. z. Anat. v. Cnicus benedictus L., Arch. d. Pharm., 1908, CCXLVI, S. 462.

säften beobachteten, und mit den „künstlichen Zellen“, die Beijerinck (Centrbl. Bakt., 1896, II, S. 697) aus Gelatine und löslicher Stärke erhalten hat. Bei den gleichen Objekten erhalten wir statt der Schaumstruktur die Schicht in „membranartiger Form“ auf folgende Weise: Wir schneiden mit der Schere vom Blattrande oder vom Nerven einen feinen Streifen ab und wählen eine Drüse, deren Sekret ausgetreten, breitgelaufen und mehr oder weniger eingetrocknet ist. Das Öl wird vorsichtig herausgelöst, wozu sich bei harzigen und fetthaltigen Sekreten auch Ammoniak eignet (Fig. 127). Nach dem Lösen der Öle und Harze zeigt sich eine Haut, die die gleiche Ausdehnung und die gleichen Umrisse besitzt, wie die ausgetretene Sekretmasse. Zuweilen ist eine

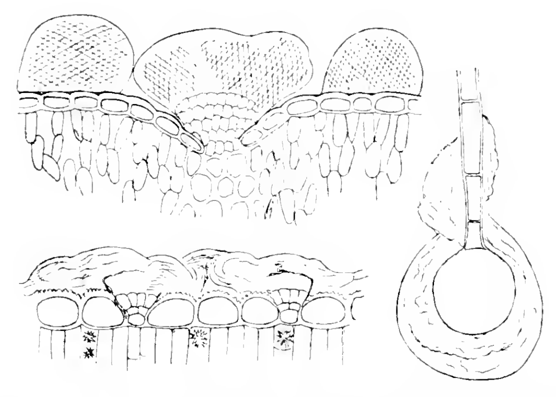


Fig. 127. Drüsen nach vollständiger Lösung der „harzigen“ Sekretanteile, der Schleim (resinog. Schicht) hat sich in membranartiger Form abgeschieden (Kunstprodukt): Grindelia (links ob., Kalilauge). Eriodictyon (unt., abs. Alkohol), Salvia glutinosa (rechts, Ammoniak, Alkohol, Äther) (Tunmann).

Streifung sichtbar, ebenfalls ein Kunstprodukt (Fig. 127). Bei künstlich entleerten Drüsen treten die Erscheinungen auch, doch nicht so gut, hervor.

Wir müssen daher annehmen, daß der Schleim (die resinogene Schicht) in den lebenden Sekretbehältern in flüssiger Form vorliegt und mit den Balsamanteilen des Sekretes eine Emulsion bildet. Nur dann, wenn die Schleimproduktion größer wird oder die Balsambildung übertrifft (schizogene Gänge, Umbelliferen, Kolleteren), ist der Schleim als Schicht vorhanden. Balsam- und Schleimbildung sind aber in der gleichen Pflanze im Laufe der Entwicklung nicht konstant. Am Ende der Vegetationsperiode überwiegt oft die Schleimproduktion. Außerdem zeigt der resinogene Schleim nicht in allen Stadien der Vegetation die gleiche Zusammensetzung. Bei Kompositen, Umbelliferen, Kolleteren

und Drüsenflächen wird er in jugendlichen Organen nach Reinigung mit Alkalien durch Jodreagentien blau, seltener blauviolett; wahrscheinlich gehen Zelluloseanteile später in Pektine über. Bei Labiaten erhielt ich nur Pektinreaktionen. — Bei den schizolysigenen Behältern bilden sich an den Außenwänden der den jungen Interzellularraum begrenzenden Zellen sog. Zellkappen, die nach Sieck[1]) „starke Quellfähigkeit" zeigen (Chloralhydrat, abwechselnde Einwirkung von Wasser und Alkohol. Färbungen mißlangen). In den Zellkappen sollen Hohlräume sichtbar sein, in denen sich „eine hyaline gelbliche Flüssigkeit mit kleinen Körnchen abgeschieden" hat, die durch „stark verdünnte Überosmiumsäure" schwach braun gefärbt wird.

Die resinogene Schicht der Ölzellen ist noch strittig. Die Befunde Biermanns (Arch. d. Pharm. 1898) finden sich bei Tschirch. Nach eigenen Befunden wird die weitere Forschung hier unbedingt von Mikrotomschnitten ausgehen müssen. Vergleiche von fixiertem und lebendem Material sind erforderlich. Der von Berthold, Haberlandt u. a. (Lit. S. 222, $_2$) aufgefundene, das Sekret umhüllende Beutel, welcher an der Wand befestigt ist, kommt für die Entstehung des Sekretes nicht in Betracht. Die Hauptfrage ist auch hier: sind in den Ölzellen mit Sicherheit schleimige Anteile (d. i. die resinogene Schicht) nachweisbar? In der ausgewachsenen lebenden Zelle fand ich stets nur einen großen Öltropfen im Zentrum der Zelle und diesen auch in Wurzeln mit einer Hülle umgeben. Diese Hülle (Beutel) hält Berthold für Zellulose, Müller für „eine stofflich umgewandelte Vakuolenwand". Bei Aristolochiaceen fand ich sie resistent gegen Säuren, Alkalien und Kupferoxydammoniak; wahrscheinlich kommt ihr nur der Charakter einer „Grenzhaut" zu. Der trichterförmige Stiel (Napf), der den Beutel mit der Membran verbindet, ist oft, doch nicht immer (Wurzeln) vorhanden. Bei weiteren Studien wäre die Frage zu prüfen, ob dieser Napf einen funktionslos gewordenen Entleerungsapparat darstellt.

Bei den Umbelliferen sind die Gänge vielfach durch Membranen ausgekleidet und zuweilen auch gefächert[2]), welche sich erst im Laufe der Vegetation bilden. Diese **Auskleidungen** betrachtet Tschirch (Harze, S. 1129) als Reste der resinogenen Schicht, während A. Meyer (Lit. S. 221, $_3$) sie zu den „amorphen" Membranen rechnet. Sie sind

---

[1]) W. Sieck, Die schizolysig. Sekretbehälter, Jahrb. wiss. Bot., 1895, XXVII, S. 197, Bern. Diss., 1895, S. 16.

[2]) Auskleidungen und Querwände finden sich auch in den vegetativen Teilen der Umbelliferen; die Bildung ist eine Alterserscheinung (Tunmann, Lit. S. 217$_1$), bei Ferula sind die Querwände sicher Ausscheidungen des Sekretes.

unlöslich in Schwefelsäure, Chromsäure, Kalilauge, Eisessig, Chloroform, Terpentinöl. Durch Salpetersäure und Kaliumchlorat werden sie gebleicht, sie lassen sich frei präparieren, wenn man die mit Ammoniak gekochten Früchte bis zum Zerfall der Perikarpien mit Kaliumchlorat-Salpetersäure erhitzt. van Wisselingh[1]) nannte die Substanz Vittin; die Vittinlamellen sollen keine Zellulosen führen; sie werden von verd. Chromsäure gelöst, geben die Cerinreaktion (s. Kork). Sie enthalten Pektinsubstanzen, da sie sich nach Vorbehandlung mit verd. Chromsäure mit angesäuerter Methylenblaulösung und mit Rutheniumrot färben. Außerdem soll aber, besonders in den mittleren Partien der Querwände, noch eine in Kalilauge leicht lösliche Substanz auftreten, die die Cerinreaktion nicht gibt. — Bei Astrantia major bestehen die Auskleidungen aus einer korkartigen Lamelle, die jedoch keine Phellonsäurereaktion zeigt, sowie aus einer verholzten Lamelle.

Phytomelane.

Phytomelane sind amorphe, schwarze, stickstofffreie Körper, deren Wasserstoff und Sauerstoff in annähernd gleichem Verhältnis wie bei den Kohlehydraten zugegen ist, deren Kohlenstoffgehalt (67—76%) ungemein hoch ist. Kompositenfrüchte führen 0.7 (Zinnia elegans) bis 6.9% (Carthamus tinctorius) Phytomelane. Sie werden durch mehrtägige Mazeration der Pflanzenteile mit Chrom-Schwefelsäure gewonnen, der Rückstand besteht aus Phytomelanen[2]). In den Früchten bilden sie möglicherweise einen Schutz gegen Austrocknung, tierische Feinde u. a. Hanausek hat auf die Wechselbeziehungen zwischen Phytomelanen und Sekreten oder Oxalaten hingewiesen. Wo Phytomelane auftreten, fehlen Sekrete und kommen nur wenig Oxalate vor.

Bisher sind Phytomelane nur in Kompositen beobachtet worden. In Wurzeln (Perezia) fanden sie Th. Greenish (Pharm. Journ. 1884) und C. Hartwich (Chem. Ztg. 1885, IX, 1298), der ihre große Widerstandsfähigkeit gegen Reagentien erkannte; H. Kraemer und M. Sollenberger beschreiben sie in Echinacea angust. (Am. Drugg. a. Pharm. Rec., 1911, 23). Nach H. Solereder kommen sie (nach F. Ebert, Beitr. z. Kenntn. d. chin. Arzneisch., Diss. Zürich 1907, 97) „in den vegetativen Teilen der Tubulifloren nicht selten vor". In Früchten, in denen sie sich zur Reife hin stark vermehren, so daß die reifen Achänen braunschwarz aussehen, wurden sie gefunden von: C. O. Harz (Samenkunde, 1885, II, 851) in Helianthus, R. Pfister (Öllierfernd. Kompositenfr., Landw. Versuchsst., 1894, XLIII) in Carthamus, A. Tschirch (Atlas 1900, 273) in Arnica, T. F. Hanausek in Helianthus annuus (Ber. d. bot. Ges., 1902, XX, 449), C. L.

[1]) C. van Wisselingh, S. les bandelettes d. Ombellif., Arch. Néerl. 1895, XXIX, S. 199.

[2]) F. W. Dafert u. R. Miklauz, Unters. üb. d. kohleähnliche Masse der Kompositen, Denkschr. Wien. Ak., 1911, LXXXVII, Sep.

Gerdts (Bau u.Entw. d. Kompositenfr., Diss. Bern 1905, 55) in Rudbeckia und Coreopsis und Ebert in Xanthium, (Carthamus) und Silybum.

Die Phytomelane stehen entwicklungsgeschichtlich mit der Mittellamelle in Beziehung, die nach Hanausek zur „melanogenen Schicht" wird. Ihre Entstehung erfolgt: 1. „an den Bastfasern mit Bildung einer primären erst farblosen, dann braunen Haut" (in den meisten Fällen, dann als zusammenhängendes Netz mit Reagentien isolierbar), 2. „an den Bastfasern ohne Bildung einer primären Haut" (selten, Arnica, dendritische Massen, Bidens, Xanthium), 3. „innerhalb des Sklerenchyms (sklerosierten Parenchyms)", in Sclerocarpus und in Heliopsis und in Wurzeln.

Nach den umfassenden Untersuchungen von Hanausek[1]), der 600 Arten untersuchte, kommen Phytomelane in vielen Kompositenfrüchten vor; in Veronieen, Astereen, Anthemideen, Calenduleen, Arctotideen sind sie bisher noch nicht gefunden; den Cichorieen fehlen sie. Die braunschwarzen Massen[2]) wurden für eingetrockneten Milchsaft (Greenish) und Farbstoff (Harz, Pfister) angesprochen oder kurz als Sekret bezeichnet (Hartwich). Hanausek bringt zuerst ihr mikrochemisches Verhalten in Zusammenhang mit Kohle. Gerdts tritt für reine Kohle ein, was Ebert bezweifelt. Die makrochemische Analyse hat den hohen Kohlenstoffgehalt bestätigt.

Zum Studium dienen bei Wurzeln und Früchten dickere Epidermis- und Tangentialschnitte, die nach Behandlung mit stärkeren Aufhellungs- und Mazerationsmitteln die schwarzbraunen Massen gut erkennen lassen. Die Massen sind unlöslich in Wasser, Glyzerin, Chloralhydrat, Salzsäure, Kalilauge, Ammoniak, Alkohol, Äther, Essigäther, Amylalkohol, Benzol, Anilin, Toluol, Chloroform, Azeton, Schwefelkohlenstoff, Petroläther, Terpentinöl u. dergl. Königswasser, Schwefelsäure, Salpetersäure sind ohne sichtbare Einwirkung, selbst beim Kochen. Daher benutzt man zur Isolierung Kaliumchlorat-Salpetersäure oder Chromschwefelsäure (S. 98 u. 454). Kieselsäure fehlt, doch hat Ebert beim Erhitzen auf dem Platinblech Schrumpfungen beobachtet und nach Gerdts löste sich ein Teil der veraschten Substanz in Säuren unter Kohlensäureentwicklung. Beide Angaben finden durch die jetzt ermittelte Zusammensetzung nur zum Teil ihre Erklärung. Ebert hat bei Xanthium und Coreopsis nach der Veraschung Eisenreaktion erhalten, läßt es aber fraglich sein,

[1]) T. F. Hanausek, Die „Kohleschicht" im Perikarp der Kompos., Sitzb. Wien. Ak., 1907, CXVI, $_1$; S. 3; Neue Mitt. über d. sog. Kohleschicht der Kompos., Wiesner Festschr., 1908, S. 139; Unters. über die kohleähnliche Masse d. Kompos., Denkschr. Wien. Ak., 1911, LXXXVII, S. 93.

[2]) O. Heineck (Z. Kenntn. d. fein. Baues d. Kompos., Diss. Gießen, 1890, S. 13) betrachtet sie fälschlicherweise als Kutikula.

ob das Eisen aus dem benachbarten Gewebe oder aus den schwarzen Massen stammt. Im Gewebe werden die Phytomelane wohl nicht in chemisch reiner Form vorliegen, so daß Beimengungen von Eisen in verschiedenen Fällen nicht ausgeschlossen sind (Fig. 128).

Die große Widerstandsfähigkeit der Phytomelane gegen Reagentien besitzen die Kerngummimassen (S. 238), besonders die der Farbhölzer und der Ebenhölzer. Die Entstehungsweise dieser Substanzen ist noch nicht aufgeklärt. Überwiegend wird, in neuerer Zeit auch von Tschirch (Lit. S. 238, 2), eine Bildung aus dem Plasma angenommen. Doch scheint sich auch die Membran, wenn auch nur sekundär, daran zu beteiligen. „Die Libriformfasern (bei Diospyros) sind dickwandig; je mehr Gummi sie im Lumen aufspeichern, umso dünnwandiger werden sie" sagt Molisch[1]), der ebenso wie Belohoubek[2]) die Füllmassen der Ebenhölzer für Humussäuren und Humuskohle deutet, was Praël (Lit. S. 98) und Will (Lit. S. 238, 3) verneinen. Im reaktionellen Verhalten bestehen zwischen den Phytomelanen der Kompositen und den Ebenholzmassen Unterschiede. Die Ebenholzmassen werden durch Kaliumchlorat-Salzsäure entfärbt und sind dann in Alkohol löslich. Den Phytomelanen wird eine Entstehung aus Zellulosen durch regressive Stoffmetamorphose zugeschrieben; hierbei können verschiedene Glieder einer Reihe entstehen.

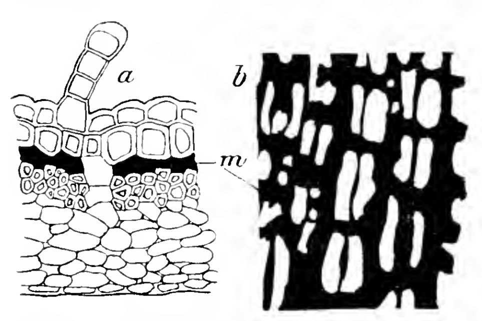


Fig. 128. Phytomelane (m). a) Arnica montana (Fruchtwand, Querschnitt), b) nach Ebert ein isoliertes Stück von Xanthium strumarium (Flächenansicht).

Schleimmembran.

In chemischer Hinsicht sind die Schleime Hemizellulosen (S. 560), meist Galakto-Arabane; sie geben bei der Hydrolyse Galaktose sowie vergärbare Zuckerarten; es kommen ganz verschiedene Hexosen in Betracht, in vielen Fällen auch Pentosen; außerdem liefern sie bei der Salpetersäure-Oxydation Schleimsäure. Da unsere Kenntnis über die Pflanzenschleime noch in vieler Hinsicht lückenhaft ist, so empfiehlt Ruhland[3]), als Schleime nur alle quellbaren, nicht fadenziehenden,

[1]) H. Molisch, Vergl. Anatom. d. Holzes d. Ebenaceen u. ihrer Verwandten, Sitzb. Wien. Ak., 1879, LXXVIII, Sep. S. 14.

[2]) Belohoubek, Sitzb. böhm. Ak., Prag 1883, S. 384.

[3]) W. Ruhland, Ber. deutsch. bot. Ges., 1906, XXIV, S. 393.

membranbildenden Polysaccharide zusammenzufassen. Zur Einteilung der Schleime benutzt schon Frank[1]) die Entwicklungsgeschichte und unterscheidet Schleime (und Gummis), die im Inhalt von Interzellularkanälen auftreten (Cycadeen, Marattiaceen), im Zellinhalt (Orchis), sowie aus der „Zellhaut“ (sekundäre Membran) entstehen (Linum, Plantago, Malvaceen). Ihm schließt sich in neuerer Zeit Tschirch[2]) an, der ebenfalls Schleime der sekundären Membran und der Mittellamelle unterscheidet.

Die Pflanzenschleime sind fast ausschließlich Membransubstanzen. Sie entstehen sehr frühzeitig, zum Teil durch Umwandlung bereits vorhandener Membranen (Interzellularschleime höherer Pflanzen und der Algen aus der Mittellamelle). Die meisten Schleime werden direkt als Schleimmembran angelegt, dann ist die sekundäre Membran eine Schleimschicht. Bereits Naegeli und Cramer[3]) faßten die Schleime aller Samen, der Wurzeln und der Cacteen als Verdickungsschichten

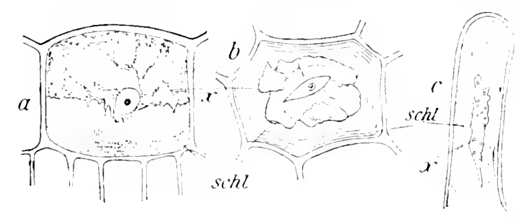


Fig. 129. Schleimbildung (lebendes Material, Alkohol-Pikrinsäure), *a*) Cassia angustifolia (Blatt, junge Epidermiszelle, Beziehung des Zellkernes zur Schleimbildung?), *b*) Althaea officinalis (Blatt, Epidermiszelle, Flächenansicht), *c*) Helianthemum spec. (Epidermis d. Samen, Amylodextrinkörner im Protoplasten); *x* = Protoplast, *schl* = Schleim (Tunmann).

auf und brachten sie in Gegensatz zum Gummi. Werden die sekundären Schleimschichten nur auf einer Seite der Zellen angelagert, dann sind sie zuweilen durch eine feine Zelluloselamelle von dem Zelllumen abgegrenzt (epidermale Schleimzellen der Blätter, Cassia, Tilia). Nach einigen Autoren wird der Schleim von Althaea (Hartwich[4])) und anderer Malvaceen, der Tiliaceen, Sterculiaceen, Rhamnaceen u. a. (Lauterbach[5]), Trécul[6])) innerhalb des Plasmaschlauches gebildet:

[1]) A. B. Frank, Über die anatomische Bedeutung der vegetabilischen Schleime, Jahrb. f. wiss. Bot., 1867, V, S. 198.

[2]) A. Tschirch, Ang. Anat. 1889, S. 193 u. Handb. d. Pharm., 1912, II, 280.

[3]) C. Naegeli u. Craemer, Phys. Unters., Zürich, Fr. Schultess, 1885.

[4]) C. Hartwich, Schleimzellen v. Althaea, Pharm. Centralh. 1891, XXXII, S. 586 und: Nat. Vers. Halle.

[5]) Lauterbach, Bau u. Entwickl. der Sekretbehälter der Cacteen, Bot. Centralbl., 1889, XXXVII, S. 371.

[6]) A. Trécul, Des mucilages chez les Malv., Sterculiac., Cact. et Orchid. indigènes, 1862, S. 314.

Frank und Wigand[1]) bezeichneten ihn als Membranschleim; nach de Bary (Vergl. Anat. S. 151) ist diese Schleimmasse „ihrer Entstehung und morphologischen Bedeutung nach nichts anderes als eine auf Kosten des Innenraumes stark verdickte Zellwand": ihnen schließen sich Tschirch und Walliczek (Lit. 176, 2) an. Nach diesen Autoren entstehen die Membranschleime „durch Ausscheiden einer Schleimlösung seitens des Plasmas zwischen der primären Zellmembran und dem Plasma" (Fig. 129). Die Orchisschleime sollen nach Frank (a. a. O. S. 161), A. Meyer[2]) und Hartwich[3]) innerhalb des Plasmaschlauches entstehen. Die Endospermschleime treten nach Frank, Tschirch und Nadelmann[4]) zuerst ebenfalls in den Vakuolen des Plasmas auf und werden dann der Wand angelagert. Auch der Schleim der Marchantiaceen ist nach Prescher[5]) eine Absonderung des Protoplasten und wird als Membranschleim abgelagert. — Die Schleimüberzüge, die die Oberfläche der Pflanzen bedecken, stammen teils aus Drüsen (Fig. 130), teils aus epidermalen Zellen. — Von den Raphidenschleimen wissen wir nur, daß sie nach den Kristallen erscheinen (s. S. 585 u. auch Gallertausscheidungen d. Algen).

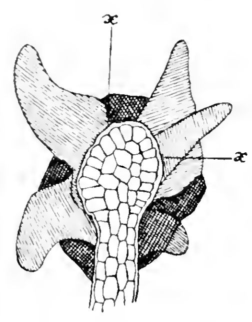


Fig. 130. Schleimdrüsen von Viola mit mehreren Schleimergüssen; bei x ist die Kutikula gesprengt (Tunmann).

Die Schleime kommen im ganzen Pflanzenreiche vor und sind für viele Familien typisch. Sie finden sich in allen Teilen der Pflanzen. Wir unterscheiden Schleimzellen, Schleimlücken und Schleimgänge. Ein vollständiges Verzeichnis schleimführender Pflanzen bei H. Solereder (Lit. S. 138, 2). In neuerer Zeit wurden die Urticaceen eingehend von P. Guérin studiert (Bull. Soc. bot., 1910, LVII, S. 399).

Die Schleime dienen als Schutzmittel, Samenschleime zum Keimungsschutz (Festkleben am Substrat, Schutz gegen Austrocknen, Quellungsmechanismus), Knospenschleime als Transpirationsschutz, Inhaltsschleime zur Wasserspeicherung und nach W. Peyer (Biolog. Unt. üb. Schutzstoffe, Flora 1911, CIII, S. 441) zum Schutz gegen Tiere (Althaea, Symphytum). Orchisschleim nimmt hier ebenfalls

[1]) A. Wigand, Über die Deorganisation der Pflanzenzelle, Jahrb. f. wiss. Bot., 1864—65, III, S. 149.

[2]) A. Meyer, Die Knollen der einheimischen Orchideen, Arch. d. Pharm., 1886, CCXXIV, S. 325.

[3]) C. Hartwich, Über den Schleim der Salepknollen, Arch. d. Pharm., 1890, CCXXVIII, S. 563.

[4]) Nadelmann, Über die Schleimendosperme der Leguminosen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1890, XXI, S. 609.

[5]) R. Prescher, Die Schleimorgane der Marchantiaceen, Sitzber. Wien. Akad., 1882, LXXXVI, 1, S. 132.

eine Sonderstellung ein und ist Reservestoff. Auch die Endospermschleime sind Reservestoffe. Bei Zutritt größerer Wassermengen gelangt der Epidermalschleim der Samen durch Sprengung der Zellen und der Kutikula an die Oberfläche (Fig. 131), was beim Einlegen von Schnitten meist nicht der Fall ist. Bei Schleimdrüsen erfolgt der Austritt nur an einzelnen Stellen der Kutikula und kann wiederholt vor sich gehen, da die subkutikulare Schleimbildung andauert (Fig. 130).

Die Schleime sind stark lichtbrechend. Nach Mangin sollen nur Zelluloseschleime doppelbrechend sein. Nach eigenen Erfahrungen sind sämtliche Schleime doppelbrechend, wenn sie trocken unter Deckglas betrachtet werden oder wenn Alkoholmaterial vorliegt. Erst bei Wasserzufuhr, beim Lösen, schwindet die Doppelbrechung langsam. In Trockenpräparaten von Linum erscheint der Schleim bei gekreuzten

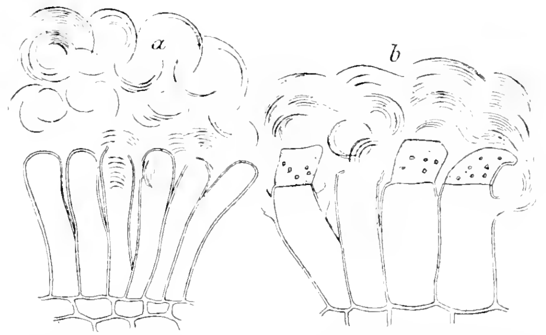


Fig. 131. Schleimentleerung der Samen bei starker Wasserzufuhr (mit Methylenblau), die Zellen zum Teil gesprengt und zerrissen: *a*) Cydonia vulgaris, *b*) Linum usitatissimum, die anhängenden Kutikulafetzen zeigen Abdrücke der Stäbchen (Tunmann).

Nicols tiefgelb, bei Wasserzutritt grau; er verblaßt schließlich. Zuweilen ist ein dunkles Kreuz sichtbar (Handelspulver deutscher Althaea und bei Orchis)[1]).

Ohne Anwendung von Reagentien zeigen die Schleime nur in wenigen Fällen eine feinere Struktur[2]). Diese tritt erst nach Behandlung mit Reagentien hervor. Es zeigen sich dann Schichten, zuweilen auch radiale Streifen, oder in den homogenen Massen radiale Risse, tüpfelartige Kanäle, ferner körnige Fällungen u. dergl. Selbst das Alter der betreffenden Organe kann von Einfluß auf die Struktur sein, so ist der Schleim jüngerer Samenhaare von Lythrum salicaria homogen, der älterer Haare strahlig radial und körnig[3]).

[1]) Die Schleimballen von Orchis leuchten in den peripheren Teilen gelb, in den zentralen Teilen blauviolett im polarisierten Lichte.

[2]) Die lebenden Schleimzellen der Zimtrinde zeigen Schichtung.

[3]) Grütter, Über Bau und Entwickelung der Samenschleime einiger Lythrarieen, Bot. Ztg., 1893, LI, S. 1.

Die Schleime quellen in Wasser leicht auf, viele lösen sich sofort (zu den Ausnahmen zählt der Schleim von Cinnamomum cassia, der schwer wasserlöslich ist). Zum Studium muß die Quellung verzögert werden. Hierzu dient in erster Linie Alkohol. Daher wird meist Alkoholmaterial (absoluter Alkohol) oder getrocknetes und in feuchter Kammer erweichtes Material benutzt. Bei Objekten, bei denen im lebenden Zustande der Schleim beim Schneiden leicht ausfließt (Orchis, Symphytum) ist getrocknetes Material vorzuziehen. Alkohol fällt und härtet den Schleim, wobei er sich häufig gelb, selbst braun (Marchantiaceen, Prescher) färbt. Läßt man zu Alkoholpräparaten vorsichtig verd. Alkohol treten, den man durch Wasserzusatz weiter verdünnt, dann erfolgt Quellung (Frank). Gewöhnlich treten hierbei die Schichten deutlicher hervor. Schichtenbildung spricht oft (nicht immer) für die Membrannatur des Schleimes. Wird die Quellung unterbrochen und tritt bei erneutem Zusatz von Alkohol wiederum Kontraktion ein, so ist damit ein Beweis für die Schleimnatur einer Schichte erbracht. Doch kommen Abweichungen vor. Der Schleim der Samenhaare der Lythrarieen wird durch Alkohol dermaßen gehärtet, daß er sogar bei längerem Kochen mit verd. Kalilauge nicht mehr zum Quellen gebracht werden kann! — Auf die Einwirkung des Alkohols und auf seinen Konzentrationsgrad wird zum Teil die Veränderung des Schleimes der Haare der Musafrüchte beruhen, für welche Jähkel (Lit. S. 562.1) keine Erklärung beibringen kann. Durch mehrjährige Einwirkung von Alkohol war der Schleim knorpelig geworden, löste sich in heißem Wasser und quoll nicht in Kalilauge und Eau de Javelle. Nach zweitägiger Mazeration mit Salzsäure-Alkohol (1—3 T. Säure, 3—4 T. Alkohol) löste er sich leicht in Wasser. Reine Salzsäure und eine Mischung von 4 T. Salzsäure und 1 T. Alkohol waren wirkungslos. Der Schleim einer vor acht Jahren lebend in 90 % Alkohol eingelegten Althaeawurzel ist unter Deckglas unlöslich in Wasser, Chloralhydrat und Kupferoxydammoniak. Es kommt offenbar nicht nur auf die Natur des Schleimes und auf den Alkohol allein an, sondern auch auf die anderen in der Pflanze befindlichen Körper (Säuren?). — Auch Strukturänderungen ruft der Alkohol hervor; im natürlichen Zustande homogene Schleime erhalten Schichtung, Cacteenschleime nach Longo (Just Jahrb., 1896, I, 482) Schwammstruktur.

Glyzerin kann oft Alkohol ersetzen, die Quellungserscheinungen sind ebenfalls von dem Konzentrationsgrad des Reagens abhängig. In konz. Glyzerin halten sich die Schleime augenscheinlich unverändert. Messungen zeigten, daß in geschlossenen Zellen bei Orchis- und Althaeaschleimen (gut verkittete Deckglaspräparate) nach 1 Monat nur geringe Quellungszunahme erfolgt war. In verd. Glyzerin tritt mehr

oder weniger rasch Verquellung ein. Konz. Rohrzuckerlösung leistet in vielen Fällen ebenfalls gute Dienste (Orchis, Scilla, Althaea, Sinapis u. a.). Walliczek, der gegenteiliger Ansicht ist, hat wahrscheinlich keine konzentrierte Lösung benutzt. Der Orchisschleim des Saleppulvers wird selbst nach mehreren Tagen wenig angegriffen.

Alkohol und Glyzerin sind die Hauptreagentien und wurden früher fast ausschließlich benutzt[1]). Als weitere Beobachtungsflüssigkeit empfiehlt Walliczek Rizinusöl-Alkohol (1 + 1). Die Schichtung des Alkoholmaterials bleibt erhalten. Quellung erfolgt nicht, die Präparate werden aufgehellt. Zu Dauerpräparaten läßt man unter Deckglas den Alkohol des Gemisches verdunsten und schließt dann ein. Ohne Antiseptikum finde ich die Präparate nur kurze Zeit haltbar. Rizinusöl erschwert eine Weiterbehandlung der Schnitte. Vielfach ist Bleiessig (Orchis, A. Meyer) ein gutes Gerinnungs- und Härtungsmittel. Alkoholmaterial, mit Bleiessig behandelt, gestattet zuweilen Entfernung der Stärke. Cacteen-, Barosma-, Cassiaschleim quillt auch in Bleiessig (Walliczek). Mangin (Lit. S. 564, $_4$) hat ferner Eisenvitriol, Quecksilberchlorid und -azetat, Alaun und Chromalaun zur Gerinnung herangezogen. Doch stehen alle diese Mittel insofern dem Alkohol nach, als sie nur für bestimmte Fälle brauchbar sind, bei anderen versagen. Alaun bringt den Schleim des gewöhnlichen Leins zum Gerinnen, aber nicht den des großblumigen. Zudem kann bei Alkoholhärtung mit allen Farben gefärbt werden, während man bei der Wahl der anderen Härtungsmittel gleich die später anzuwendenden Farbstoffe berücksichtigen muß.

Zum Färben der Schleime bediente man sich anfangs ausschließlich der Jodreagentien. Jodjodkalium färbt die Schleime nur sehr schwach gelb (Cydonia rötlich), während das (eiweißhaltige) Plasma weit kräftiger gefärbt wird, doch kommt gleichzeitig der Schleim zum Quellen. Bessere Erfolge geben Jodglyzerin, alkoholische Jodlösung mit nachfolgendem Glyzerinzusatz oder Jodzuckerlösung.

Der Schleim mancher Bakterien, der wahrscheinlich durch Verquellung der äußeren Membranschichten entsteht, färbt sich bei B. Pasteurianum und B. Kützingianum hellblau mit wenig Jodjodkalium (A. Meyer, Chlamydosp. u. Zellmembr. b. Bakt., Ber. bot. Ges., 1901, XIX, 428). Die Schleimfäden der Bakterien in den Wurzelknöllchen der Papilionaceen werden mit Chlorzinkjod in ihrer ganzen Dicke blau, die eingeschlossenen Bakterien nehmen dabei gelbbraune Färbung an (W. Beijerinck, Nat. d. Fäden d. Papilionaceenknöllchen, Centrbl. Bakt., 1894, XV, 728). Auch die Schleimschicht in den Drüsenflecken von Populus nigra wird durch Jodjodkalium gebläut (Tunmann, Lit. S. 222, $_3$).

[1]) Auch von Flückiger, Buccubl., Schw. Wchschr. Ch. u. Ph., 1873, XI, 435.

Mit Jodschwefelsäure (Ausführung S. 549) färben sich einige Schleime blau bis violett (Salvia, Hofmeister, 1858, Cydonia, Kützing, 1852, Cruciferen[1]), Cramer, 1855), die meisten werden nur gelb oder bleiben farblos (Marchantiaceen, Orchis, Trigonella, Althaea, Linum). Erstere wurden von Tschirch (Anat., S. 193) als Zelluloseschleime, letztere als echte Schleime bezeichnet. Die Reaktion läßt aber keine sichere Deutung zu. Denn gerade bei Linum, Salep u. a., die mit Jodschwefelsäure gelb werden, also echte Schleime wären, hat die makrochemische Analyse (Tollens) einen Zellulosegehalt ergeben. Überdies treten beide Färbungen sogar an dem gleichen Objekte auf. Nach Schaar[2]) werden die Schleimschichten der Antheridien von Polytrichum mit Jodschwefelsäure zunächst gelbbraun, später erst blau. Die Reaktion tritt in der Mittellamelle zuerst und am stärksten auf. Außerdem ist bei Samen das Entwicklungsstadium von Einfluß. Bei Magonia glabrata (O. Rosenberg, Lit. S. 508) wird der Schleim noch kurz vor völliger Reife der Samen mit Chlorzinkjod intensiv blau (Stärke fehlt), während bei vollständig ausgereiften Samen der Schleim sich mit Jodreagentien nicht mehr färbt. Die Gummischleimmembran im Perikarp der Tarihülsen wird blaugrau (Hanausek, Lit. S. 379, $_2$). Der Schleim der Scilla maritima wird mit Jodschwefelsäure rötlich (Hartwich, 1889). Hingegen sind die Jodreagentien geeignet, um „plasmatische“ Fäden, die den Schleim durchsetzen (und die in älteren Schleimzellen deutlicher ausgebildet sind als in jungen), besser sichtbar zu machen (Orchis, Aloe).

Zuweilen (Pektinschleim der Mittellamelle) hat den Jodreaktionen eine Vorbehandlung der Schnitte mit verd. Kalilauge (bis mehrere Tage) voranzugehen. Die Interzellularschleime der Algen, die mit Jod meist nur gelb werden, zeigen nach der Reinigung mit Kalilauge Zellulose- und Hemizellulosereaktionen. — Soll Jodschwefelsäure zur Ermittlung von Zellulose in Schleimen dienen, dann muß die Reaktion an „gereinigten Schleimen“ vorgenommen werden. Die Reinigung wird oft schwierig sein. Der Schleim müßte zuvor derart gehärtet werden, daß eine Alkalibehandlung durchführbar wäre.

Kupferoxydammoniak löst viele (Symphytum, Plantago), doch nicht alle Schleime, oft mit intensiv blauer Farbe (Trigonella); andere Schleime quellen sehr stark auf (Orchis). Der Schleim von Althaea wird nicht gelöst, der von Linum bildet eine feste Gallerte.

[1]) d'Arbaumont, Nouv. observ. s. les cellules à mucilage des graines d. Crucifères, Ann. sc. nat. Bot., 1889, II, S. 125.

[2]) F. Schaar, Bau u. Art der Entleerung der reifen Antheridien bei Polytrichum, Ber. deutsch. bot. Ges., 1897, XV, S. 479

Bei der Reaktion mit Kupfersulfat-Kalilauge (A. Meyer) werden die Schnitte einige Min. in konz. wässer. Kupfersulfat belassen (nur aus den angeschnittenen Zellen quillt der Schleim heraus) und dann in Ätzkali (50%) übertragen. Die Schleime von Orchis (A. Meyer), und der Malvaceen (Nestler) werden blau, der Parenchymschleim von Urginea wird grünlich (Hartwich).

Seit Hanstein (Lit. S. 221, 1) werden Anilinfarben zur Charakteristik herangezogen. Mangin teilt die Schleime in verschiedene Gruppen: Zelluloseschleime (sind selten, Orchis) werden durch Salzsäure-Alkohol völlig unlöslich und durch Jodreagentien kaum verändert; sie sind doppelbrechend und färben sich in saurem Bade mit Orseillin BB, Azorubin, Naphtholschwarz u. a., in alkalischem Bade mit Kongorot, Deltapurpurin, Benzopurpurin. Pektoseschleime (Malvac., Rosac., Tiliac., Cycadeen u. a.) geben fadenziehende Lösungen, werden durch Bleiazetat, Sublimat, Alaun und Eisenvitriol zur Gerinnung gebracht, durch Jodreagentien gelb gefärbt. Sie färben sich in neutralem Bade mit Bismarckbraun, Methylenblau, Methylgrün, Hämatoxylin[1]), Neutralrot. Diese Färbungen sind nur in 1—2% Borsäure einige Zeit haltbar und schwinden schnell in Alkohol, Glyzerin und Säuren. Hingegen gibt Rutheniumrot haltbare Färbungen; man läßt die gefärbten Schnitte an der Luft eintrocknen und schließt sie in Kanadabalsam ein (Linum, Plantago Psyllium, Cydonia, Cruciferen, Malvaceen). Nach Mangin sollen diese Schleime optisch inaktiv sein (s. S. 579). Calloseschleime (finden sich in Geweben, die der Auflösung entgegengehen) sind optisch inaktiv, lösen sich ohne Quellung in verd. Natron- und Kalilauge, quellen auf ohne sich zu lösen in alkalischen Karbonaten und Ammoniak. Sie färben sich in saurem Bade (Essigsäure) mit Anilinblau, in alkalischem Bade mit Rosazurin. Auch Corallin-Soda färbt. Diesen „einfachen“ Schleimen stellt Mangin „gemischte“ Schleime gegenüber: besonders verbreitet sind Gemische von Zellulose- und Pektoseschleime.

Es wird meist schwer sein, auf Grund von Färbungen die Natur eines Schleimes bestimmen zu können, wahrscheinlich, weil überwiegend Mischschleime auftreten. So färbt wässer. Kongorot (Heinricher, Lit. S. 552, 3) dunkelorangerot die Schleime von Althaea, Linum, Plantago Psyllium, Cydonia, Lepidium sativum, Orchis (lebendes und Alkoholmaterial). Der Schleim der Meerzwiebel wird von wässer. Kongorot orangerot (Hartwich) gefärbt, ebenso der Antheridienschleim von

[1]) A. Giraud, Du développement et de la localisation des mucilages chez les Malvacées officinales, Toulouse, Thèse, 1894, S. 6. Die Färbungen mit Hämatoxylin sind violett (Cydonia) bis blau (Malvaceen).

Polytrichum (Schaar). Eine Lösung in 70% Alkohol färbt Cacteenschleim, nicht aber den von Tilia (Walliczek). Der Schleim der Drüsen von Gunnera magellanica speichert Methylenblau und Bismarckbraun, nicht aber Kongorot und Jodreagentien[1]. Der Schleim der Haare der Acanthaceensamen färbt sich mit Methylgrün, Methylviolett, Kongorot und Safranin[2]. Die Malvaceenschleime werden mit alkohol. Safranin orange, mit Alkanna stahlblau, mit alkohol. Methylenblau blau[3]. Hansteins Anilingemisch (S. 236) färbt den Schleim von Orchis rötlichgelb, von Scilla maritima violett (Hartwich), der Cacteen rötlich (Walliczek) und gibt bei Malvaceen, Urticaceen, Linum, Plantago, Cinnamomum cassia, Trigonella violettrote Färbungen (Tunmann). Corallin (S. 557) färbt Orchis orangerot, Scilla karminrot (Hartwich), Endospermschleime schlecht (Nadelmann). Rutheniumrot färbt Cycadeen, Linum, Cydonia, Malvaceen, Cruciferen, Plantago, aber nicht Orchisschleime. — Bei Färbungen von lebendem oder Alkohol-Material muß der Farbstoff entweder in wässeriger oder in verd. alkoholischer Lösung (50—70% Alkohol) angewandt werden. Farblösungen, die mit konz. Alkohol hergestellt sind, färben meist nicht. Bei entwicklungsgeschichtlichen Studien muß man den Schleim vom Plasma unterscheiden. Diese Differentialdiagnose ist nicht leicht. Selbstverständlich muß man zur Beobachtung nur intakte Zellen wählen. Am schwierigsten ist die Feststellung des Hyaloplasmas. Ob die Plasmahaut stets mit Sicherheit identifiziert wurde, bleibt fraglich. Hierzu werden Doppelfärbungen empfohlen (Mangin). Bei Pektoseschleimen färbt ein Gemisch von Naphthylenblau und Säuregrün JEEE Plasma grün, Schleim blau, bei Calloseschleimen ein Gemisch von Anilinblau und Bismarckbraun Plasma violettschwarz, Schleim blau. Walliczek legt die mit Eosin oder Nigrosin in (70% Alkohol) gefärbten Schnitte in absoluten Alkohol bis sich der Schleim entfärbt hat, „während der Plasmakörper durch den gehärteten Schleim verhindert wird, seine Farbe abzugeben." Meist wurden aber die Untersuchungen an Alkoholmaterial ausgeführt und nähere Angaben über die Konservierung (Stärke des Alkohols) nicht gemacht; hierdurch können schwerwiegende Irrtümer entstehen. Ganze Orchisknollen, die längere Zeit in 80% Alkohol gelegen hatten, zeigten eine „zentrale Höhlung" im Schleime, die bekanntlich für Membranschleim charakteristisch ist.

[1] J. Reimnitz, Morph. u. Anat. v. Gunnera magell., Diss., Kiel, 1909.

[2] E. Schaffnit, Beitr. z. Anat. der Acanthaceensamen, Bot. Centralbl., Beih., 1906, XIX, S. 453.

[3] A. Nestler, Die Schleimzellen der Laubblätter der Malvaceen, Öster. bot. Ztschr., 1898, XLVIII, Nr. 3. Sep.

Erforderlich sind stets Nachprüfungen an lebendem Material. Ausgedehnte Verwendung verdiente die an lebenden Zellen ausgeführte Plasmolyse (Neutralsalzen) mit nachfolgendem Fixieren, sowie in einigen Fällen polarisiertes Licht.

Der **Raphidenschleim**, der als sackartige, homogene oder vakuolige Hülle die Raphiden einschließt (Fig. 26, S. 107), ist in chemischer Hinsicht ganz unbekannt. In seinem reaktionellen Verhalten weicht er meist von den Membranschleimen ab und steht den Pektinschleimen am nächsten. Zellulose führt er niemals. Er ist optisch inaktiv, quillt in Wasser unter Lösung langsam auf, schrumpft in Alkohol, bleibt in Jodzuckerlösung und Jodglyzerin sehr lange erhalten. Mit Jodreagentien färbt er sich im allgemeinen weit stärker als die Membranschleime, wird zuweilen (Urginea) mit Jodschwefelsäure rötlich. Die mit Kongorot und Corallin erhaltenen Färbungen weichen ebenfalls von den der Membranschleime ab. Methylgrünessigsäure, Gentianaviolett, Eosin färben oft nicht. Hierher zählen auch jene Schleime, die in den sog. „unvollkommenen Raphidenschläuchen" (ohne Raphiden) bei verschiedenen Rubiaceen, Ampelideen, Onagrarieen u. a. vorkommen.



Fig. 132. Polyporus officinalis, Schleimhyphe (Tunmann).

Ein eigenartiges Verhalten zeigt der Schleim der Schleimhyphen mancher Pilze (Polyporus off.)[1]) und Flechtenpilze (in der Flechte Physma dalmaticum)[2]), der der Membran entstammt. Hyphenäste und -enden oder bestimmte Strecken von Hyphen verdicken sich und nehmen dabei häufig wulstige und bizarre Formen an; ein Zelllumen ist nicht zu erkennen (Fig. 132). Die Schleimhyphen sind farblos, stark lichtbrechend, zuweilen (besonders im Alter) geschichtet, bis 250 μ groß und sehr widerstandsfähig. Sie sind unlöslich in konz. Mineralsäuren und in verd. Alkalien, quellen sehr wenig in Kupferoxydammoniak, nach längerer Zeit etwas in Chloralhydrat und in Wasser erst nach Wochen. Jodreagentien färben gelblich. Zellulosereaktionen sind auch nach Behandlung mit Alkalien und verd. Säuren nicht zu erhalten. Hierher zählen jedenfalls die von Buchholz (Lit. S. 237, 3) aufgefundenen Bildungen. Bei Hymenogaster decorus „erscheinen sie

[1]) Hier scheinen Beziehungen zwischen Schleim- und Harzhyphen zu bestehen, wie diese Tschirch bei den Schleim- und Ölzellen der Laurineen auffand (O. Tunmann, Lit. S. 94, 2 u. 217, 1).

[2]) Em. Senft, Üb. eigentüml. Gebilde i. Thallus d. Flechte Physma dalmaticum, Sitzb. Wien. Akad., 1907, CXVI, 1, S. 429.

wie massive Glasstäbe, hin und her gewunden, scheinbar ohne Inhalt, jedoch in Wirklichkeit ganz mit einer lichtbrechenden Substanz erfüllt".

Schließlich seien die Befunde von Sorauer (Ber. bot. Ges., 1912, XXX, 42) über die Schleimkrankheit von Cyathea medullaris erwähnt. Dort entstehen im Grundgewebe Schleimlakunen. Die dem Verschleimungsprozeß anheimfallenden Zellen vergrößern sich und zeigen ein durch freie Zellbildung entstandenes Maschennetz. Bei Färbung mit Methylgrün-Eosin wird das gesunde Gewebe leuchtend rosenrot, das erkrankte grün. Eisensulfat schwärzt alle Membranen, „um so intensiver, je erkrankter dieselben sind." Chlorzinkjod (frisch bereitet) färbt gesundes Parenchym tiefblau, die erkrankten Gewebe und die Schleimmasse braungelb. Bei den eben erwähnten Maschenzellen wird die Membran der Mutterzelle blau, die der Tochterzellen gelbbraun. Alizarin zeigt bei nachfolgendem Auswaschen alle erkrankten Teile und die Schleimmasse rot, das gesunde Gewebe ist entfärbt. Die Endprodukte des Verschleimungsprozesses erstarren nach dem Austritt aus der Pflanze nicht, im Gegensatz zum Gummi der Amygdalaceen. Erstere werden mit Salzsäure rot, letzterer gelb.

Gallertausscheidungen der Algen.

Als Gallerte bezeichnen wir den physikalischen Zustand einer schleimigen Substanz, die bei übermäßiger Wasserzufuhr so stark verquellen kann, „daß ihr Zustand als fester Körper zu weichen anfängt" (F. Schütt, Lit. S. 441, 1). Die Gallertauflagerungen enthalten keine Zellulose (Jodschwefels. u. Chlorzinkjod färben nicht blau), überziehen die ganzen Pflanzen (Zygnemaceen) oder nur bestimmte Teile (Desmidiaceen) und bilden einen Schutz gegen Reibung (des Wassers u. a., W. Hunger, Funkt. d. oberflächl. Schleimbild., Diss. Jena, 1899). Sie werden vom Plasma teils durch Poren (Schütt), teils durch feine Kanäle aus schizogenen Gängen (Laminarien, Guignard) nach außen abgeschieden.

Die Gallerthüllen fallen in Wasserpräparaten nur wenig auf, da ihr Brechungsindex kaum von dem des Wassers abweicht. Bei starker Vergrößerung und abgestelltem Lichte sind sie besser sichtbar. Zur Sichtbarmachung bei schwacher Vergrößerung benutzt man Tuschepräparate (Errera, Einlegen der Objekte in einen Tropfen Wasser, in dem man etwas chinesische Tusche bis zur dunkelgrauen Färbung verrieben hat) oder trägt in Dahlia, Neutralrot, Karbolfuchsin, Safranin ein. Man kann auch den Tuschepräparaten wässer. Lösungen von Thionin oder Gentianaviolett zusetzen (Schroeder)[1].

Die Gallertscheiden der **Zygnemaceen** bestehen aus einer Grundsubstanz und aus Einlagerungen (Klebs, Lit. S. 552, 2). Die Grundsubstanz ist zart, sehr schwach lichtbrechend, nicht quellungsfähig, in

[1]) L. Errera, S. l'empoli de l'encre de Chine en micr., Bull. Soc. belge d. Micr., 1884, X, S. 478. — B. Schroeder, Gallertbild. d. Alg., Verh. nat.-med. Ver. Heidelberg, 1902, VII, Heft 2 u.: Planktonpflanzen aus Seen v. Westpreußen, Ber. d. bot. Ges., 1899, XVII, S. 156.

heißem Wasser unlöslich, schwer und kaum färbbar und löst sich nur in stärkeren Säuren. Die Einlagerungen treten erst nach Behandlung mit Alkohol und nach Färbung mit nicht zu verd. wässerigen Lösungen[1]) von Methylenblau, Methylviolett, gerbsaurem Vesuvin und Fuchsin in Gestalt kleiner Stäbchen hervor, die sich nahe der Zellwand zuweilen zu einem feinen Netzwerk vereinigen. Sie bilden die Hauptmasse der Gallertsubstanz, lösen sich in Chlorzinkjod auf und können mit heißem Wasser ausgezogen werden. Die Scheiden nehmen in einer Lösung von 1 % Glykose und 0.5 % Pepton an Dichtigkeit zu. Die Ursache dieser Erscheinung ist nicht aufgeklärt. Klebs bringt sie mit dem Stickstoffgehalt und der leimartigen Natur der Einlagerung in Beziehung.

Charakteristisch ist die Fähigkeit der Gallerte nach Einlagerung gewisser Niederschläge den in Wasser löslichen, stäbchenförmigen Bestandteil der Scheide zu verquellen und abzustoßen. Die Wirksamkeit der Niederschläge hängt von der Größe und der Form der Niederschlagsteilchen ab (Klebs). Deutlich kristallinische und grobkörnige Niederschläge bewirken keine Verquellung. Geeignet sind einige Eisen- und Chromverbindungen. Eine Anzahl Algen, die man in der Mitte mit einem Faden zusammenbindet, werden in 0.25 % milchsaurem Eisenoxydul umgeschwenkt (1—2 Min.), auf einen Augenblick durch frisches Wasser gezogen und in 0.25 % Ferricyankalium gebracht (Turnbulls Blau). Durch Wiederholung der Reaktion gelingt es die Scheiden tiefblau zu färben, ohne daß die Lebenstätigkeit der Algen leidet, die in reinem Wasser weiter kultiviert werden können. In gleicher Weise kann man 0.25 % Kaliumchromat und 0.25 % Bleiazetat benutzen. Bei den Niederschlägen geht die Abstoßung um so schneller vor sich, je weniger Turnbulls Blau oder Chromgelb eingelagert ist. Bei starker Einlagerung vollzieht sie sich erst innerhalb einiger Tage.

Bei den **Desmidiaceen** sitzen den Zellwandporen kugelige Gallertkappen auf[2]), welche in Diastase (5 Min. bei 30—35°)[3]) stark aufquellen. Man setzt den unter Deckglas liegenden lebenden Desmidiaceen anfangs sehr verd., allmählich konz. Lösungen von Gentianaviolett, Fuchsin, Methylenblau, Neutralrot, ferner Methylenviolett oder Safranin zu und

[1]) Verd. Lösungen färben die Scheiden homogen, konz. bedingen Kontraktion der Scheiden.

[2]) P. Hauptfleisch, Zellm. u. Hüllgall. d. Desmidiaceen, Diss. Greifswald, 1888, O. Müller, Kammern u. Poren in der Zellwand der Bacillariaceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1898, XVII, S. 400 u.: J. Lütkemüller, Zellm. d. Desmidiaceen, Cohns Beitr., 1902, VIII, S. 347.

[3]) A. Andreesen, Beitr. zur Kenntnis der Desmidiaceen, Flora 1902, XCIX, S. 373.

beobachtet die Einwirkung der Farbstoffe, die unter Wasserentziehung kontrahierend auf die Gallertmassen wirken. Bei in Alkohol gehärtetem Material läßt sich die Gallerte von der Membran durch plötzlichen starken Stoß auf das Deckglas trennen.

Bei **Protococcoideen** ist zur dauernden Färbung gerbsaures Vesuvin geeignet. Die Gallerte von Coelastrum reticulatum widersteht der Schwefelsäure-Einwirkung, nimmt Farbstoffe schwer auf, Fuchsin färbt vorübergehend nach Vorbehandlung mit Chloralhydrat. Bei Dictyosphaerium pulchellum Wood. zeigt die Gallerte nach Färbung deutliche radiale Streifung. Mit Kaliumchromat-Bleiazetat entsteht ein Niederschlag von Bleichromat, doch findet hierbei keine Abstoßung statt (s. ob.). Oocardium stratum Naegeli zeigt eine relativ dünne Stäbchenschicht, die nach Färbung (gerbs. Vesuvin, wässer. Anilinblau) scharf hervortritt und eine strukturlose amorphe Gallerte (Senn)[1]. — Die Gallertmembran von Volvox tertius erscheint deutlich geschichtet, wenn man nach Färbung mit verd. Methylenblaulösung eine schwache Jodjodkaliumlösung zufließen läßt. Bei dieser Methode wird die Gallerte bei V. aureus und V. globator nur körnig (Lit. S. 525, $_3$).

Den Färbungen der Gallertscheiden kommt bei verschiedenen Gattungen ein diagnostischer Wert zu (F. Brand, Charakt. Algen-Tinktionen, Ber. d. bot. Ges., 1907, XXV, 497). Exsikkate werden zuvor 1 Tag lang in schwach essigsäurehaltigem Wasser aufgeweicht und dann auf 24 Stunden in eine verd. Farblösung gelegt (R. Chodat, Bull. Boissier, 1897, 302).

Die Gallertauflagerungen der **Phaeophyceen** und **Florideen** haften den Algen so fest an, so daß sie selbst bei Drogen noch erhalten sind, auch wenn diese längere Zeit gewässert haben. Sie verhindern oft den Eintritt von Farbstofflösungen ins Gewebe. Zur Sichtbarmachung bei Drogen eignen sich Methylenblau (violett) und Safranin (orange). Beim Erwärmen unter Deckglas ballen sich die Gallerthäute zusammen, ohne sich zu entfärben, durch Jodreagentien werden sie mehr oder weniger gelb, Kupferoxydammoniak löst sie (Chondrus) nicht (Tunmann, Lit. S. 509).

Hier seien die von Bruns (Lit. S. 510, $_2$) beobachteten Leuchtkörper erwähnt, die sich bei Florideen in der Gallertschicht in den Winkeln von zwei oder drei zusammenstoßenden Epidermiszellen finden. Es sollen solide, rundliche oder ovale Körper sein, die bei starkem Druck Risse und Spalten erhalten; sie leuchten nur im auffallenden Lichte auf, sind unlöslich in Wasser, Kalilauge, Salz- und Schwefelsäure, färben sich mit Jodlösungen blau und speichern Methylenblau

[1]) G. Senn, Über einige koloniebildende einzellige Algen, Bot. Ztg., 1899, LVII, S. 39.

und Bismarckbraun. Osmiumsäure läßt sie unverändert (Bonnemaisonia asparagoides) oder färbt nur etwas dunkel (Antithamnion cruciatum).

Gummi.

Als Pflanzengummi fassen wir klebrige, fadenziehende Polysaccharide zusammen, die ganz überwiegend der Membran entstammen. Es sind Körpergemische, die neben anorganischen Substanzen (Kalzium, Magnesium, Kalium u. a.), Enzymen, Methylpentosanen u. a. hauptsächlich aus Arabanen und Galaktanen (in wechselnder Zusammensetzung) bestehen. Denn die Gummis liefern bei der Hydrolyse meist neben nicht näher erforschten Methylpentosen vorzüglich Galaktose und Arabinose, jedoch keine (im Gegensatz zu den Schleimen) vergärbare Zuckerarten (Hexosen). Näher bekannte Bestandteile der Gummiarten sind Arabin (wasserlöslich, im Gummiarabikum), Cerasin (metarabinsaurer Kalk, quellbar, im Kirschgummi) und Bassorin (quellbar, im Bromeliaceengummi und im Tragant). Von einer ganzen Anzahl Gummiarten liegen Analysenbefunde vor. Doch muß bemerkt werden, daß die diesen Analysen zugrunde liegenden Gummis in ihren physikalischen und zum Teil in ihren chemischen Eigenschaften nicht völlig mit den im Gewebe auftretenden Gummimassen übereinstimmen.

Die Ansichten über die Gummibildung stimmen nicht überein. Nach vielen Autoren (u. a. Wigand [Lit. S. 578 1], Moeller[1]) setzt die Gummibildung in der primären Membran ein und schreitet von außen nach innen fort, nach Grüss (Lit. S. 427, 1) wird die sekundäre Membran hydrolytisch in Gummi übergeführt, welches die tertiäre Membran durchbricht und sich im Zelllumen ansammelt. Tschirch (Anat. S. 196 u. 210) sagt: „Die Vergummung scheint hier (Amygdalaceen) von der mittleren Membran auszugehen“, aber beim Kirschgummi „zuerst wird die primäre Membran und zuletzt werden die inneren Schichten von außen nach innen aufgelöst“. Nach Mikosch (Lit. S. 379, 1) beginnt die Bildung beim Kirschgummi jedoch „stets in den Verdickungsschichten und schreitet von hier nach außen hin fort; zuletzt werden die primären Membranen gelöst“. Bromeliaceengummi entsteht ausschließlich in der Mittellamelle (Boresch)[2]. Lutz[3]) schließt sich der Ansicht von Mohls[4]) über die Bildung des Tragants aus den Membranen des Markes und der Markstrahlen an. Nach Butler[5]) beginnt bei Prunus und Citrus die Gummosis in den sekundären Lamellen und greift dann in die primäre Membran über. Den Gummifluß bei Steinobstbäumen hat Linsbauer (Verh. d. öst. Obstb.- u. pom. Ges. 1911) verfolgt. — Jedenfalls setzt die Gummibildung in der Membran ein und erhält die

[1]) J. Moeller, Acaciengum., Sitzb. Wien. Ak., 1875, LXXII, 1, 219.

[2]) K. Boresch, Über Gummifluß bei Bromeliaceen, nebst Beitr. zu ihrer Anatom., Sitzb. Wien. Akad., 1908, CXIII, S. 1033.

[3]) L. Lutz, Sur la mode de formation de la gomme adraganta, Bull. Soc. bot. France, 1910, LVII, S. 250.

[4]) H. v. Mohl, Entstehungsw. d. Tragant, Bot. Ztg., 1857, XIV, S. 36.

[5]) O. Butler, A study on gummosis of Prunus and Citrus usw., Ann. of Bot., 1911, XXV, S. 107.

Bildungsstoffe aus dem Zellinhalte[1]). Zwischen Gummi-, Schleim- und Harzbildung scheint im Pflanzenreiche völlige Übereinstimmung zu herrschen. Alle drei Prozesse scheinen nach gleichen Gesichtspunkten zu verlaufen. Legt doch Mikosch (Fig. 133) der Gummibildung den gleichen Vorgang zugrunde, den Tschirch für die Schleimbildung (Althaea) und für die Bildung des ätherischen Öles in Ölzellen angibt (Ausscheidung von gummibildenden Substanzen durch den Plasmaschlauch und Anlagerung dieser an die Zellwand). Wie bei den Schleimen wird man eine Gummibildung aus primärer und aus sekundärer Membran unterscheiden können; doch läßt sich hier die Genese nicht zur Einteilung benutzen, da beide Entstehungsweisen oft gleichzeitig erfolgen.

Die Gummosis wird meist als ein pathologischer Vorgang angesprochen, der auf Wundreizen (mechanische Verletzungen, Tiere, Mikroorganismen, Smith, Ruhland, Ber. d. bot. Ges., 1907, XXV, S. 302 u. a.) und auf enzymatischen Prozessen (auch Beijerinck, Rant, Rech. s. l. nécrobiose, Corbeil, 1905) beruht. Doch kommt normalerweise in nicht verletzten Organen Gummi vor (Gummigänge, im jungen Frühjahrsholz, Grüss). Nicht alles Gummi ist nutzloses Sekret. Nach Grüss verläuft bei der Gummosis ein normaler Vorgang nur „übernormal". Zur Wundheilung scheint Gummi nicht in gleicher Weise wie Harz zu dienen. „Die, verschiedenen Bromeliaceen zugefügten Stichwunden heilten durch Korkbildung aus" (Boresch). Der Gummifluß zeigt vielfache Übereinstimmung mit den von Tschirch für den Harzfluß ermittelten Gesetzen. Durch den Wundreiz wird vom Kambium ein gummierzeugendes Gewebe gebildet.

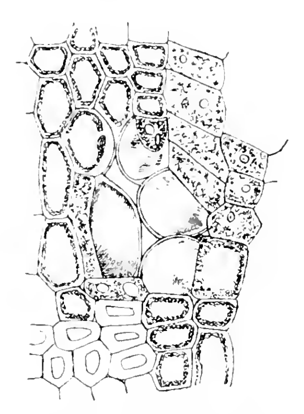


Fig. 133. Prunus, Gummibildung in den Zellkappen eines Interzellularraumes: mit Benutzung einer Zeichnung v. Mikosch u. Iltis.

Gummibildung erfolgt in vielen Familien (Amygdalaceen, Leguminosen, Bromeliaceen, Aurantiaceen, Combretaceen, Meliaceen, Sterculiaceen, Anacardiaceen, Araliaceen u. a.).

Gummi läßt sich derzeit nur dann mit einiger Sicherheit im Gewebe nachweisen, wenn durch den makrochemischen Befund die Anwesenheit von Gummi sichergestellt ist. Dies ist beim Gummifluß der Fall, bei dem größere Gummimassen auftreten und man an der Oberfläche der Pflanzenteile ausgetretenes Gummi antrifft. Bei geringen Gummimengen ist der Nachweis nicht einwandfrei zu erbringen, besonders ist eine Unterscheidung von Gummi, Pektinmassen und Schleimen

[1]) Zu den bei der Gummibildung benutzten Zellstoffen zählen Phloroglykotannoide und Stärke, letztere läßt beim Kirschgummi enzymatische Einwirkung erkennen (mit Jod rotbraun), bei Bromeliaceen nicht (mit Jod nur blau); vergl. außerdem F. v. Höhnel, Material, welches zur Bild. d. arab. Gum. in der Pfl. dient, Ber. d. bot. Ges., 1888, und J. Wiesner, Chem. Ztg., 1906 u. a.

ungemein schwierig. Bei einiger Vorsicht im Präparieren kann man lebendes Material anwenden. Die Schnittfläche wird von dem ausgeflossenen Gummi befreit, die ersten Schnitte werden verworfen. Unter den folgenden Schnitten finden sich meist einige brauchbare Präparate (Mikosch). Ob eine Übertragung der schmierigen Gummisubstanz auf andere Gewebe stattgefunden hat, läßt sich auf optischem Wege ermitteln. Ein allen Anforderungen genügendes Härtungsmittel ist nicht bekannt. Alkohol unter 50% härtet nicht und stärkerer Alkohol macht das Material für das Schneiden zu spröde und bewirkt in zartwandigen Elementen „Rißbildungen und Schrumpfungen, die auch bei nachherigem Wasserzutritt nicht mehr rückgängig gemacht werden können". Bei längerem Liegen in Alkohol bildet Gummi zuweilen Wabenstrukturen (Bromeliaceen, Boresch, s. S. 589, 2). Brauchbar ist öfter Austrocknen des Materials. Kleinere Stücke werden bei mäßiger, langsam ansteigender Wärme getrocknet. Versuche mit Schleimhärtungsmittel wären zu erproben. Die einzelnen Gummiarten werden naturgemäß verschiedene Härtungsmittel erfordern.

Bei Präparaten[1]) lebenden Materials dient das polarisierte Licht als brauchbares Hilfsmittel. Die Zellwände sind bekanntlich doppelbrechend, leuchten bei gekreuzten Nicols auf. Alle in Gummibildung begriffenen Wände haben diese Fähigkeit verloren, sind optisch isotrop (Astragalus creticus, Prunus, W. Hofmeister [Pflanzenzelle, S. 345], Mikosch). Liegt aber getrocknetes oder Alkoholmaterial vor, so werden die Gummimassen mehr oder weniger anisotrop und stimmen alsdann mit dem ebenfalls anisotropen Handelsgummi überein (Wiesner). Der diagnostische Wert der optischen Verhältnisse erfährt eine Einschränkung, denn nach eigenen Befunden zeigen viele in Schleimbildung sowie in Pektinmetamorphose befindlichen Wände das gleiche Verhalten. Im gewöhnlichen Lichte treten Gummimassen und Gummimembranen hell hervor und heben sich von den normalen Zellwänden durch ihr Lichtbrechungsvermögen ab.

Ein Spezialreagens für sämtliche Gummiarten gibt es nicht und kann es bei der wechselnden Zusammensetzung des Gummis nicht geben; man müßte denn ein gutes Reagens auf die stets anwesenden Galaktosen ermitteln. Dadurch sind ebenfalls die sich widersprechenden Befunde über Färbungen zu erklären. Man wird in erster Linie die Hauptbestandteile vieler Gummis nachzuweisen suchen. Da Gummi sich nicht so leicht wie viele Schleime im Wasser löst, oder bis zur Unkenntlichkeit verquillt, so kann man Wasserpräparate studieren. Auf

---

[1]) Von Kirschgummi lassen sich Halbdauerpräparate mit Rizinus-Alkohol (gleiche Teile) herstellen.

diese läßt man zunächst stark verd. Alkohol (20 %), allmählich konz. einwirken und stellt sofort die bei jedem erneuten Zusatz eintretenden Veränderungen fest.

Arabin, der wasserlösliche Anteil mancher Gummis (Kirschgummi) wird an der körnigen Fällung erkannt, die Alkohol, noch mehr angesäuerter Alkohol, hervorruft und die bei Wasserzutritt wieder verschwindet (nach Mikosch soll Arabin im Zellinhalte auftreten). Cerasin zeigt, wenn es in der Gummimasse überwiegt bei Alkoholzusatz keine Trübung, sondern wird homogen kontrahiert und ist in Kalkwasser löslich (Mikosch fand es in- und außerhalb der Zellen). Bassorin ist wasserunlöslich und steht möglicherweise den Pektinen nahe. Chloralhydratlösungen (20—40 %) werden sich ebenfalls diagnostisch verwerten lassen.

Des weiteren werden Färbungen ausgeführt. Vielfach ist man der Ansicht, daß die Färbungen wenig beweisen, doch geben die gefärbten Präparate einen besseren Einblick. Mangin benutzte Rutheniumrot (s. Pektine), wahrscheinlich sind Gummis, die sich mit Rutheniumrot färben, bassorinreich. Lutz[1]) wendet ferner an: Neutralrot (2.25 T. Casella Rot in 20 T. Alkohol, 90 %, und 30 T. destill. Wasser) und Säuregrün (10 T. in gleicher Lösung). Neutralrot färbt Gummi rosafarben und rot. Färbt man mit Säuregrün nach, so werden die Plasmakörper grünlichblau und die Membranen sollen nach Mikosch rotorange, nach Lutz grün werden. Hansteinsches Anilinviolett (S. 236) gab mir bei Prunus stark rosenrote Färbung. Boresch färbt Bromeliaceengummi mit Anilinblau und Gentianaviolett.

Gummimembranen (Amygdalaceen) färben sich mit Chlorzinkjod gelb und geben, falls sie verholzt waren. Phloroglucinsalzsäurereaktion. Die braunen Gummimassen von Aechmea miniata var. discolor führen einen (mit Eisensulfat grün werdenden Gerbstoff). Das Gummi von Quesnelia roseo-marginata wird mit Jodkalium oder Jodwasser grün (Boresch).

Frank (Ber. bot. Ges., 1884, II, 321) gibt Gummikörnchen an, die sich nicht in Wasser (auch nicht in warmem), Alkohol, Äther, Kalilauge, Schwefelsäure lösen, Fuchsin speichern, Phloroglucinsäurereaktion geben und beim Kochen mit Salpetersäure Oxalsäure und Schleimsäure liefern.

Eine Gummimembran gibt Heinricher (Lit. S. 94, 1) in der Schwellschicht der Kapsel von Lathraea clandestina an (stark quellbar, unlöslich in Wasser und Alkohol, löslich in Eau de Javelle, nicht färbbar mit Kongorot, Corallin-Soda und Jodreagentien). — Über die Bildung des Chagual-Gummi hat Hartwich berichtet (Ztschr. öst. Ap. Ver., 1896, XL, 565), über Moringa-Gummi machten Jadin und Boucher Angaben (Bull. sc. pharm. 1908, S. 247).

---

[1]) L. Lutz, Sur la marche de la gommose dans les Acacias, Bull. Soc. Bot. de France, 1895, LII, S. 467.

Holzmembran.

Die älteren Autoren faßten die Holzmembran als ein Gemenge von Zellulose und „Inkrusten" (Frémy, Lignin [de Candolle]) auf. Die Inkrusten geben die für Holz typischen Reaktionen. Jetzt wird angenommen, daß in der Holzmembran eine einheitliche komplexe Verbindung vorliegt, eine esterartige Verbindung der Zellulose mit aromatischen Stoffen. Die Natur der aromatischen Substanzen ist noch strittig (Vanillin, Coniferin, Czapeks Hadromal). Sicher ist, daß sich unter den Abbauprodukten des Holzes Brenzkatechin und Protokatechusäure finden und daß sich aus den Sulfitlaugen Brenzkatechin, Vanillin und Methylfurfurol gewinnen lassen. Die bei niedriger Temperatur ausgeführte Hydrolyse liefert Essigsäure und Ameisensäure; der aromatische Komplex führt demnach Formyl- und Azetylgruppen. Der Menge nach treten die aromatischen Anteile stark zurück. Viele Hölzer enthalten 80% an Zellulose und Hemizellulosen (Mannan, Galaktan, Xylan).

Über die physiologische Bedeutung der Verholzung sind die Ansichten geteilt. Nach Sachs bewirkt die Verholzung „Steigerung der Härte der Zellhaut, Verminderung ihrer Dehnbarkeit, leichte Durchdringlichkeit für Wasser ohne bedeutende Aufquellung". Sonntag sagt, daß verholzte Membranen „eine große Duktilität zeigen, sie sind imstande, auch über die Elastizitätsgrenze hinaus auf sie wirkenden Kräften nachzugeben", Schellenberg, „daß die verholzte Membran nicht mehr wachstumsfähig sein möchte" (wird von Nathansohn, Jahrb. wiss. Bot., 1898, XXXII, 671, verneint). Jedenfalls werden die mechanischen Eigenschaften einer Membran durch die Verholzung nicht verändert[1]).

Verholzte Membranen sind stärker lichtbrechend als die reinen Zellulosemembranen und leuchten im polarisierten Lichte auf, starke Wände zeigen hierbei ein dunkles Kreuz. Sie sind mehr oder weniger gelb. Bei ultramikroskopischer Betrachtung zeigen sie annähernd parallele Reihen stark leuchtender und großer Micellen, zwischen denen sich optisch leere Reihen finden (Gaidukov, Lit. S. 439).

Als verholzt wurde früher jede Membran angesprochen, die mit Jodreagentien keine Zellulosereaktion gab und sich mit Kalilauge gelb färbte. Auch Chlorzinkjod (jetzt noch zuweilen benutzt, gelb) ist kein Verholzungsreagens, da es in gleicher Weise mit Hemizellulosen und Pektinen reagiert. Schon 1834 fand Runge (Pogg. Ann., XXXI, 65), daß ein Holzspan mit Phenolsalzsäure bei Belichtung blaugrün wird. Die Reaktion führten Tiemann u. Haarmann (Ber. chem. Ges., 1874, VII, 608) auf Coniferin zurück. Der mikrochemische Nachweis wurde von Wiesner erbracht.

[1]) J. Sachs, Lehrb. d. Bot., IV. Aufl., 21. — P. Sonntag, D. Beziehung. zwisch. Verholzung, Festigkeit und Elastizität veg. Zellwände, Landw. Jahrb. (H. Thiel), 1892. — H. C. Schellenberg, Beitr. z. Kenntn. d. verholzt. Zellmembran, Jahrb. f. wiss. Bot., 1896, XXIX, 237. — Warburg, Ber. bot. Ges., 1893, XI, 425.

Anilinsulfat wurde, anknüpfend an die Befunde Schapringers, von Wiesner[1]) eingeführt. Die Schnitte werden auf dem Objektträger in Anilinsulfat gelegt (1. Anilins., 70. Wasser, 30. Alkohol, 3. Schwefels.). In gleicher Weise läßt sich salzsaures Anilin[2]) benutzen. Der Säurezusatz verstärkt die Färbung (gelb), die sich in Dauerpräparaten hält. Da aber Oxalate von den Säuren nach längerer Zeit angegriffen werden, so ist für Dauerpräparate eine Lösung von 2 ccm Anilin, 4 ccm Essigsäure und 194 ccm 50 % Alkohol anzuraten[3]). Bei an sich stark gelb gefärbten Membranen tritt die Reaktion nicht augenfällig in Erscheinung.

v. Höhnel[4]) fand, daß Kirschholzextraktlösung mit Salzsäure kräftig rotviolett färbt und nannte die wirksame Substanz Xylophilin. Wiesner[5]) zeigte aber, daß ein Gemisch von Phloroglucin und Brenzcatechin vorliegt und führte die Phloroglucinsalzsäure-Reaktion ein. Die Schnitte kommen auf dem Objektträger in Phloroglucinalkohol (0.1 : 10.0, bei Lichtabschluß jahrelang haltbar), dann wird das Deckglas aufgelegt und nach einiger Zeit (wenn ein Teil der Lösung verdunstet ist) am Deckglasrande etwas Salzsäure zugefügt. Man kann auch eine Lösung aus 0.1 Phloroglucin, 6.0 Alkohol und 4.0 Salzsäure benutzen. Verholzte Membranen werden violettrot. In Dauerpräparaten ist die Färbung nicht haltbar, sie verblaßt und wird gelblich.

Einige Zeit war die Zuverlässigkeit der Phloroglucinsalzsäure in Frage gestellt. Mäule[6]) fand, daß verschiedene Bastfasern, die sich mit Phloroglucinsalzsäure rot färben, in ihrem physikalischen Verhalten mit unverholzten Membranen übereinstimmen. Er führte als Verholzungsreagens Kaliumpermanganat ein. Die Präparate gelangen auf 5 Min. in eine Schale mit 1 % wässer. Permanganatlösung; sie färben sich braun. Nun werden sie ausgewaschen, indem man die Lösung abgießt und mit Wasser auffüllt. Alsdann werden die Schnitte 2 Min. lang mit verd. Salzsäure behandelt, abgewaschen und auf dem Objektträger mit Ammoniak versetzt oder Ammoniakdämpfen ausgesetzt (Ammoniakflasche). Die Reaktion ist etwas zeitraubend. Bei Objekten, die gerbstoffartige Körper enthalten, müssen zur Erzielung klarer

[1]) Schapringer, Dingl. polyt. Journ., 1865, CLXXVI, 166 u.: J. Wiesner, Karstens bot. Unt., 1866, 1, 200.

[2]) F. v. Höhnel, Kork u. verk. Gew., Sitzb. Wien. Ak., 1865, LXXVII, 507.

[3]) A. Falck, Simarubarind., Arch. d. Pharm., 1912, CCL, 45.

[4]) F. v. Höhnel, Histochemische Untersuchungen üb. d. Xylophilin und das Coniferin, Sitzb. Wien. Ak., 1877, LXXVII, I, 527.

[5]) J. Wiesner, Note über d. Verhalt. d. Phloroglucins u. einiger verw. Körper zur verholzten Zellmembran, Sitzb. Wien. Ak., 1878, LXXVII, I, 60.

[6]) C. Mäule, Verhalten verholzter Membranen gegen Kaliumpermanganat, Fünfstücks Jahrb., 1902.

Bilder dünne Präparate angewandt werden (Tunmann, Lit. S. 101, 1).

Mäule, v. Faber[1]) u. a. fanden nun, daß verschiedene Membranen sich mit Phloroglucinsalzsäure röten, mit Permanganat aber farblos bleiben (Hippuris, Endodermis, Quercus, Kork, Anamirta, Hydathoden, Boehmeria platyphylla, Fasern). Andererseits färben sich die Fasern von Anamirta cocculus, Erythrina lithosperma (Aisslinger) und viele primäre Fasern (Tunmann) mit Phloroglucin schwach, mit Kaliumpermanganat stark. Nach v. Faber sollte Phloroglucinsalzsäure ein Reagens auf Hadromal sein, das aber nicht in allen Holzmembranen vorkäme. Aisslinger hält Kaliumpermanganat zur technischen Prüfung der Fasern für geeignet, je brauner die Fasern werden, um so minderwertiger sind sie.

Die Differenzen klärte Géneau de Lamarlière[2]) auf. Bei der Reaktion läßt sich Kaliumpermanganat als Oxydationsmittel ersetzen durch rauchende Salpetersäure (Gelbfärbung, je länger die Säure einwirkt, um so schwächer ist die Färbung), durch Kaliumhypochlorid, mit etwas Kalilauge versetzt (Gelbfärbung) und durch 1 % bis 5 % wässer. Chromsäure (Rotfärbung). Bei Gymnospermen und Gefäßkryptogamen muß das Permanganat unbedingt ersetzt werden durch gesättigte Kaliumchloratlösung und verd. Salzsäure. Die Salzsäure ist durch andere Säuren (Schwefelsäure, Phosphorsäure), der Ammoniak durch andere Alkalien ersetzbar. Die Manganat-Reaktion tritt um so stärker auf, je stärker die Oxydation war, während gleichzeitig die Phloroglucinreaktion an Stärke abnimmt. Die Manganatreaktion wird durch ein „Ligninoxyd“ hervorgerufen; tritt sie also nicht ein, wohl aber die Phloroglucinreaktion, so muß in der Membran ein „Lignin“ vorliegen.

Die Phloroglucinsalzsäure wird mit Recht am meisten benutzt[3]). Die Reaktion ist die sicherste (färbt bereits sehr schwach verholzte Wände) und in der Ausführung die einfachste. Die Angabe Ihls, daß die Pyrrolreaktion (s. unt.) empfindlicher sei, trifft nach eigenen Befunden nicht zu. Irrtümer können nur dort unterlaufen, wo harzige Sekrete bestimmte Körper führen (Ferulasäure, Vanillin), welche die Membranen (bes. sezernierender Zellen) imprägnieren (vergl. S. 217 ob.). — Zuweilen bewirkt Salzsäure allein eine schwach rötliche oder violette Färbung. In diesen Fällen enthalten die Zellen des Präparates phloroglucidische Körper, welche die Reaktion hervorrufen.

[1]) v. Faber, Z. Verholzungsfr., Ber. d. bot. Ges., 1904, XXII, S. 167.

[2]) L. Géneau de Lamarlière, Recherches sur quelques réactions des membranes lignifiées, Rev. gén. de Bot., 1903, XV, S. 149.

[3]) B. Korn, Unters. üb. techn.-mikr. Unterscheid. einiger Fasern, insbes. d. Leinen- u. Hanffaser, Diss. Dresden 1910.

Später wurden weitere Reaktionen bekannt, die aber sämtlich der Phloroglucinsalzsäure-Reaktion nachstehen.

Rote, violette und **blauviolette** Färbungen geben folgende Reaktionen: Resorcin (Wiesner, alk. Lös + Salzs., violett), Orcin (Ihl, Chem. Ztg., 1885, IX, 266, alk. Lös. + Salzs., dunkelrot), Pyrrol (Ihl, Chem. Ztg., 1890, XIV, 1571), Methylheptenon (Erdmann, Ber. chem. Ges., 1899, XXXII, 1213), Dimethylparaphenylendiamin (Wurster, Ber. chem. Ges., 1887, XX, S. 808), Indol (Niggl, Flora 1881, LXIV, 545, wässer. Lös. + Schwefels. [1 + 4], kirschrot), Skatol (Mattirolo, konz. alk. Lös. + Salzs., violett), Carbazol (Mattirolo, Ztschr. wiss. Mikr., 1885, II, 354, konz. alk. Lös., Erwärmen + Säure [1 + 1]) u. a. Auch Glieder der aliphatischen Reihe können benutzt werden. Amylalkohol (A. Kaiser, Chem. Ztg., 1902, XXVI, 335, gleiche Vol. furfurolfreier Amylalkohol u. konz. Schwefels., bis zur Gasentwicklung erwärmt, ein rotgelbes Gemisch, färbt rot bis blau), Isobutyl- u. Hexylalkohol (Grafe, Öst. bot. Ztschr., 1905, LV, 174), 2 Vol. + 1 Vol. Schwefels., 30 Min. Einwirkung, färbt rotviolett, beim Einlegen in Glyzerin blau.

Von diesen Reaktionen beansprucht die mit Isobutylalkohol Beachtung, bei der sich Ferula- und Kaffeesäure nicht färben (bei Sekretbehältern u. a.).

Grüne bis **blaue** Färbungen geben: verschiedene Phenole in Verbindung mit Salzsäure. Auch Bromwasserstoffsäure färbt blaugrün (Grafe, Monatsh. Chem., 1904, 1029). Die Angabe H. Warneckes (Pharm. Ztg, 1888, XXXIII, 574), daß rauchende Salzsäure allein die Farben bedingt, trifft nicht für alle Hölzer zu, auch wird durch Phenol die Färbung verstärkt. Man benutzt: Phenol (v. Höhnel, konz. wässer. Lös., mit Kaliumchlorat gesättigt + Salzs.), Pyrogallol (Wiesner), Kresol, Guajacol (Czapek, Ztschr. phys. Chem., 1899, XXVII, 141), Anisol, Anethol (Ihl), Naphthol, Thymol (Molisch, Ber. bot. Ges., 1886, V, 303, alkohol. Lös. + Kaliumchlorat + Salzs.). — Auch Thiophen (Ihl) gibt Grünfärbung.

Gelbe Färbungen geben: Diphenylamin (Ellram, Lit. S. 837), Lepidin (Ihl), α u. β Naphthylamin (Nickel, Lit. S. 1921), Paratoluidin (Singer, Sitzb. Wien. Ak., 1882, LXXXV, 345), Metaphenylendiamin (Molisch, Verh. zool. bot. Ges. Wien, 1887, 30) u. a.

Orange Färbungen geben: Toluilendiamin (R. Hegler, Flora, 1890, LXXIII, 31, konz. wässer. Lös. + Salzs., färbt stärker als Anilinsulfat, haltbar in Gelatine, Schnitte zuvor gut mit Fließpapier abtrocknen), Thallinsulfat (konz. Lös. [Wasser + Alkohol, 1 + 1], färbt haltbar ohne Säure, wichtig für oxalatführende Dauerpräparate), Phenylhydrazin (färbt zuweilen, Lit. S. 1881).

Die angeführten „Ligninreaktionen“ sollen nach Wiesner, Singer, de Wèvre [1]), Hegler u. a. durch Vanillin-Coniferin hervorgerufen werden. Hegler wollte mit Thallin-Thymol die Mengenverhältnisse der beiden Stoffe ermitteln (0.5 Thallinsulfat, 1.0 Thymol, 2 ccm Wasser,

[1]) A. de Wèvre, La lignine, Bull. Soc. Belg. Micr., 1889, XV, S. 49.

26.5 ccm Alkohol, 0.5 Kaliumchlorat, vor Gebrauch + 1 Vol. Salzs.). Thallin reagiert nur mit Vanillin (gelb), Thymol nur mit Coniferin (blau)[1]. Überwiegt Vanillin (junge Holzwände), so wird die Färbung mehr gelb, überwiegt Coniferin (alte Holzmembranen), dann entsteht eine mehr blaue Färbung. Nach Nickel[2]) sprechen die Reaktionen nur für aromatische Aldehyde (Anilinsulfat. reagiert auch mit Salicylaldehyd, reines Vanillin reagiert schwächer als Holz) und Seliwanoff[3]) zeigte, daß Holz Aldehydreaktion mit Fuchsin-schwefl. Säure (violett, S. 230, $_2$) gibt: nach Vorbehandlung mit Hydroxylamin bleibt die Reaktion aus. Nach Czapek kommen die Reaktionen dem Hadromal (1-3-4-Substitutionsprodukt des Benzols) zu. — Durch Pilze (Merulius, Armillaria u. a.) werden die Ester der Holzsubstanz zerstört.

Verholzte Wände sind (im Gegensatz zur Zellulose) unlöslich in Kupferoxydammoniak, aber löslich in konz. Chromsäure (wie Zellulose und Hemizellulosen und im Gegensatz zu Kork und Kutikula). In konz. Schwefelsäure[4]) löst sich Holz schwer, meist erst nach längerer Zeit; sehr stark verholzte Wände sind unter Deckglas zuweilen unlöslich.

Die aromatischen Anteile des Holzes werden entfernt[5]) durch mehrtägige Mazeration mit Eau de Javelle, durch Kaliumchlorat-Salpetersäure und Bromwasser mit Nachbehandlung mit Ammoniak. Vorangehende Reinigung des Holzes mit verd. Salzsäure ist oft zweckmäßig. Derart behandelte Holzwände führen nur noch die Zellulosen (Jodreaktion). Mit Eau de Javelle behandelte Holzwände speichern Metalle (Kupfer, Eisen, Blei, Nickel, Kobalt, Kadmium, nicht Quecksilber, Gold, Platin)[6]).

Die Farbstoffspeicherung des Holzes (S. 553) kommt wahrscheinlich Hemizellulosen und Pektinen (Devaux) oder nicht näher bekannten

[1]) Nach de Wèvre wird Coniferin Schuchard mit Phenolsalzs. nicht blau, nach Czapek Coniferin Merck mit Thymolsalzs. blauviolett, dann rot.

[2]) E. Nickel, Farbenreaktion u. Aldehydnatur des Holzes, Bot. Centralbl., 1889, XXXVIII, S. 753.

[3]) Seliwanoff, Holzstoff u. seine Reaktionen, Bot. Centralbl., 1891, XLV, S. 279.

[4]) Durch verd. Schwefelsäure (2 + 1 Wasser) wird Coniferenholz gelb, grün, bei Wasserzusatz blaugrün: die Färbung ist nur makroskopisch benutzbar, O. Linde, Z. Kenntn. d. Verholz., Arch. d. Pharm., 1906, CCXLIV, S. 57.

[5]) L. Mangin, S. l. reactifs jodés de la cellulose, Bull. Soc. bot. France, 1888, XXXV, 425. — A. Zimmermann, Mikrochem. Reakt. v. Kork u. Kutikula, Ztschr. wiss. Mikr., 1892, IX, 63. — K. Kroemer, Wurzelhaut, Hypodermis, Endodermis, Diss. Marburg, 1903, S. 8.

[6]) M. Devaux, Généralité d. l. fixation d. métaux p. l. paroi cell., Soc. Linn, de Bordeaux, 1901.

Stickstoffsubstanzen des Holzes (Lamarlière) zu: schon Heinricher führte die Fuchsinfärbung auf „Holzgummi" zurück. Behandelt man Holz (Vitis) mit Kaliumchlorat-Salzsäure, dann tritt keine Reaktion mit Phloroglucin ein, doch kräftige Färbung mit Jodgrün.

Kurz erwähnt sei die Reaktion von Combes[1]), die eine Rotfärbung gibt (Eau de Javelle, ½ Std., Auswaschen, Kochen mit 1.0 Zinkoxyd (od. Bleioxyd) in 30.0 Wasser, 1 Std., Abwaschen, Schwefelwasserstoffwasser, 5 Min., Abwaschen, Einlegen auf dem Objektträger in konz. Schwefelsäure).

Kleine lichtbrechende Kügelchen fand Heinricher (Lit. S. 94 1) in lebenden Zellen der Haustorialköpfe von Lathraea, die sich bei Alkoholzusatz zu größeren vereinen und ihre Lichtbrechung einbüßen, mit Jodreagentien gelbbraun werden, in Äther unlöslich sind. Die nach der Behandlung mit Eau de Javelle zurückbleibenden Tröpfchen färben sich wie verholzte Membranen mit Fuchsin. Es soll eine aus den verholzten Membranen der Wirtspflanze stammende Substanz gummiartiger Natur vorliegen. Ligninkörper gibt Hartwich (Lit. S. 259 3) in der Nahrungsschichte der Infectoriagalle an; es sind cystolithenartige Wucherungen der Zellwände, die auch bei anderen Gallen auftreten (Küstenmacher, Lit. S. 254 2).

Kork und Kutikula.

Der Charakter von Kork (Suberin), Kutikula (Kutin) und kutinisierten Membranen wird von Fettsäuren bestimmt (Stearin-, Suberin-, Phloionsäure [Kügler, Gilson], besonders Phellonsäure: letztere ist eine hydrocyklische Verbindung, die bei Oxydation in die aliphatische Phellogensäure übergeht, v. Schmidt). Die Säuren kommen neben Cerin zum Teil als Glyzeride vor, der junge Kork enthält wahrscheinlich nur Glyzeride; die eigentliche Korksubstanz (Suberinlamelle) älterer Gewebe besteht aus Anhydrid- und Polymerisationsprodukten fester und flüssiger Fettsäuren. Im Kutin (Agaveblätter, Apfel) finden sich Stearo- (fest) und Oleokutinsäure (flüssig) sowie ein Gemenge beider (Kutose, Frémy u. Urbain, Phellonsäure fehlt, van Wisselingh). Zellulose fehlt in Kork und Kutikula und ist nur in den kutinisierten Membranen nachweisbar. Es scheinen Differenzen im Chemismus von Suberin und Kutin der gleichen Pflanze zu bestehen. Wahrscheinlich finden sich auch Abweichungen im Suberin und Kutin bei verschiedenen Pflanzen (Gilson fand Phloionsäure nur in Quercus, nicht in Ulmus).

Kork und Kutikula besitzen sehr geringe Durchlässigkeit für Wasser und Gase, schützen die Pflanzen vor zu starker Verdunstung. Im Innern der Gewebe regeln sie die Bahnen des Stofftransportes (Endodermis, Casparysche Streifen, A. Meyer, Kroemer) und ermöglichen einen relativen Abschluß der Sekrete (Öldrüsen und Sekretbehälter). Die Permeabilität hängt offenbar von verschie-

[1]) R. Combes, Nouv. groupe de réact. d. l. lignine et d. membranes lignifiées, Bull. Soc. pharmacol., 1906, XIII, S. 293.

denen Faktoren ab. Kork von Beta und die Kutikula von Allium ist für Salze impermeabel (W. Wächter, Lit. S. 447), die Kutikula von Cynara für Salzlösungen permeabel (J. K. Goebel, Diss., Leipzig, 1903, S. 20).

Über die Bildung der Kutikula sind wir im unklaren. Sie bedeckt bereits die jugendlichsten Organe als ein kontinuierliches Häutchen. Meist bleibt sie dauernd erhalten. Eine Auflösung (Enzyme) erfolgt zuweilen bei nachträglicher Verbindung von ursprünglich freiangelegten Organen (Bild. d. Scheidewände d. Cruciferen, E. Hannig, Bot. Ztg., 1901, LIX, 207). Eine Regeneration nach künstlicher Abtragung hat Tittmann (Jahrb. f. wiss. Bot., 1897, XXX, 116) bei Agaven und bei Aloe festgestellt. Die von Hanstein (Lit. S. 221, 1) angegebene Regeneration bei den Epidermaldrüsen findet jedoch nicht statt (Tunmann, Lit. S. 222, 4). Es kommt nur (bei Schleimdrüsen, Fig. 134) zur Bildung sehr widerstandsfähiger, sog. Grenzhäutchen (auch bei H. Kraemer, Diss., Marburg, 1897). Hingegen findet sich Neubildung der Kutikula bei den sog. Doppelhaaren (Lit. S. 541, 1).

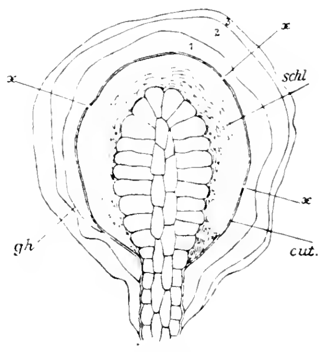


Fig. 134. Drüse von Viola, nach mehreren Schleimergüssen; nur eine Kutikula (*cut*), die bei *x* gesprengt ist, *gh 1, 2, 3* sind Grenzhäutchen (Tunmann).

Bei ultramikroskopischer Betrachtung zeigen Korkmembranen das gleiche Bild wie verholzte Wände: annähernd parallele Reihen stark leuchtender und großer Micellen wechseln mit optisch leeren Reihen ab (Gaidukov, S. 439). Im polarisierten Lichte zeigen Kutikula und Kork ebenso wie reine Zellulosemembranen starke Doppelbrechung [1]), die, und dies ist das Charakteristische, beim Erhitzen der Membranen auf 100° verschwindet, um beim Erkalten wieder aufzutreten [2]). Suberin und Kutin bewirken eine, wenn auch geringe Erniedrigung der von der Zellulosemembran gegebenen Polarisationsfarben. Die eigentlichen Suberinlamellen sind meist zart. Bei den Korkzellen ist die Mittellamelle meist verholzt, der beiderseits Suberinlamellen anliegen, die wiederum von Zelluloseschichten eingefaßt werden; die letzteren können zuweilen ebenfalls mehr oder weniger verholzen (Cytisus).

Die Mikrochemie von Kork und Kutikula beruht auf Lösungs-

[1]) Im allgemeinen sind die optischen Achsen in den kutinisierten und verkorkten Membranen umgekehrt orientiert wie in den Zelluloselamellen: erstere zeigen Subtraktionsfarben, letztere Additionsfarben, wenn bei gekreuzten Nicols die Kutikula parallel zu der längeren Achse des Gipsplättchens verläuft. (A. Zimmermann, Molekularphys. Unters., Ber. d. bot. Ges., 1884, II, 124).

[2]) H. Ambronn, Optisch. Verhalt. d. Kutikula u. d. verkorkt. Membranen, Ber. d. bot. Ges., 1888, VI, S. 226.

reaktionen, der Cerinreaktion und auf Färbungen. — Chromsäure, in größerem Maßstabe zuerst von v. Höhnel (Lit. S. 594, 2) benutzt, liefert in bequemer Weise sichere und für die Praxis oft genügende Ergebnisse. Man benutzt eine konz. Chromsäurelösung (50 %). In dieser löst sich das gesamte Gewebe bis auf Kork- und Kutinmembranen (u. verkieselte Membranen, S. 104). Bei größeren Präparaten erschwert die bei der Lösung eintretende Gasentwicklung eine Beobachtung während der Einwirkung, macht sie zuweilen unmöglich. Man unterbricht daher die Reaktion, indem man nach einigen Minuten Wasser durchsaugt und die Wirkung der Säure mikroskopisch feststellt. Das Verfahren (abwechselnder Zusatz von Säure und Wasser) wird bis zum gewünschten Erfolge fortgesetzt[1]). Bei einiger Übung wird man bereits bei Beginn der Reagenseinwirkung zu einem Ergebnis gelangen, da die Suberinlamelle sich sowohl von der verholzten Mittellamelle als auch von der aufquellenden und schnell in Lösung gehenden Zellulose scharf abhebt. Von der Anwendung einer schwächeren Lösung (als 50 %) ist abzuraten, ebenso darf nicht erwärmt werden, da kochende Chromsäure Kork- und Kutinlamellen löst[2]). Übrigens ist die Unlöslichkeit in kalter Chromsäure nur eine relative, denn nach längerer Zeit (einige Tage) gehen Kork und Kutikula je nach dem Grad der Verkorkung und Kutinisierung in Lösung; die nur schwach kutinisierten Lamellen lösen sich weit leichter[3]). Weniger scharf treten Differenzen in der Löslichkeit zwischen der Kutikula und der Suberinlamelle hervor; Suberin scheint weniger widerstandsfähig zu sein. Erhitzt man die Präparate im zugeschmolzenen Röhrchen in Glyzerin auf 300°, dann gibt nachher Chromsäure mit der Suberinlamelle (im Gegensatz zur Kutikula) ein sehr leicht lösliches Zersetzungsprodukt[4]).

Kork- und Kutinlamellen sind unlöslich in konz. Schwefelsäure und in Kupferoxydammoniak. Diese beiden Reagentien (völlig konz. Säure, frisch bereitetes Cuoxam.) können zur Orientierung dienen. Sie liefern keine guten Bilder, Holz erscheint durch Kupferoxydammoniak bei mikroskopischer Betrachtung kaum verändert und wird durch Schwefelsäure nur sehr langsam gelöst.

Die v. Höhnelsche Cerinsäure-Reaktion ist recht charakteristisch, für praktische Zwecke aber etwas umständlich. Verkorkte

[1]) C. Hartwich, Sarsaparill., Ber. pharm. Ges., 1907, XVII, S. 262.

[2]) F. v. Höhnel, Bemerk. üb. d. Kutikula, Öst. bot. Ztschr., 1878, XXVIII, S. 84.

[3]) Den Algen fehlt meist eine Kutikula; die Schleimoberhaut (Laminaria) ist in Chromsäure löslich.

[4]) C. v. Wisselingh, Cuticul. et cutine, Arch. Néerl., 1894, XXVIII, 373.

Lamellen widerstehen in der Kälte länger als andere Membranen Kaliumchlorat-Salpetersäure; kocht man jedoch einige Zeit, dann bilden sich kleine ölartige Tröpfchen, die, ähnlich wie die fetten Öle, ineinanderfließen und die sich in Äther, heißem Alkohol, Benzol, Chloroform und in verd. Kalilauge lösen, in Schwefelkohlenstoff unlöslich sind und bei 30—40° schmelzen. Diese Substanz wird Cerinsäure genannt.

3% alkoholische Kalilauge löst bei andauerndem Kochen die Suberinlamelle ohne Rückstand auf, während Zellulose bei dieser Behandlung nicht angegriffen wird. Hiermit ist erwiesen, daß in der Suberinlamelle Zellulose fehlt (Gilson). — Konz. Kalilauge bewirkt nach einiger Zeit deutliche Gelbfärbung. Beim Erwärmen tritt die Färbung schärfer hervor. Ähnlich verhalten sich verholzte Wände. Beim Aufkochen werden die verkorkten Membranen aber körnig, erscheinen mit feinen Tröpfchen bedeckt, die bei längerem Kochen in Gestalt größerer Tröpfchen hervortreten und hier und da ganz aus der Membran austreten. Es ist ratsam, die Reaktion nach dem Vorschlage Kroemers[1]) erst nach Mazeration der Präparate mit Eau de Javelle (s. unten) und Auswaschen derselben mit 1% Salzsäure vorzunehmen. Im allgemeinen soll nach van Wisselingh die Kutikula länger der Lauge widerstehen als Suberinlamellen. Die Kutikularschichten erweisen sich gegen Kalilauge sehr wenig widerstandsfähig.

Jod-Schwefelsäure und Chlorzinkjod färben Kork und Kutikula gelb, auch braun. Chlorzinkjod wurde früher vielfach benutzt. Die Reaktionen sind aber nicht eindeutig, da Holz, Hemizellulosen und verschleimte Membranen sich ebenso verhalten. Werden die Schnitte aber zuvor 1—2 Stunden mit Eau de Javelle behandelt, dann färbt Chlorzinkjod Holz schmutzig violett, Kork und Kutikula gelb.

Werden die Präparate mehrere Stunden mit 40% Natronlauge (Gilson)[2]) mazeriert oder mit der Lauge kurz aufgekocht, dann gibt nach gutem Auswaschen Chlorzinkjod (auch Jodjodkalium) mit Suberinlamellen eine rotviolette Färbung. Diese Färbung hat man früher auf einen Zellulosegehalt der betreffenden Membran zurückgeführt; sie wird durch Phellonsäure hervorgerufen und bleibt aus, wenn der Behandlung mit Chlorzinkjod eine Extraktion der Schnitte mit siedendem Alkohol vorangeht. Auch wird das Suberin zerstört, wenn man die Präparate in Glyzerin auf 250—290° erhitzt; ein Zelluloserückstand ist dann nicht nachweisbar. In den kutinisierten Schichten läßt sich

[1]) K. Kroemer, Wurzelh., Hypodermis u. Endodermis, Diss., Marburg, 1903, S. 9 u. Bibl. bot. Heft 59.

[2]) E. Gilson, La subérine et les cellules du liège, La Cellule, 1890, VI, S. 63—114.

aber nach Mazeration mit verd. Alkalien durch Jodreagentien eine zellulosehaltige Grundlage nachweisen (van Wisselingh)[1].

Kutikula und Korkmembranen einiger Pflanzen (Nymphaea, Ranunculus, Helleborus, Convallaria, Ilex, Rosmarinus u. a.) geben mit Fuchsin-schweflige Säure (S. 230) eine violette Färbung (Aldehyd, Géneau de Lamarlière, Bull. Soc. bot. France, 1903, S. 268).

Färbungen sind für Kork und Kutikula charakteristisch. Da diese Membranen Fettsäuren enthalten, so benutzt man seit Correns[2]) die sog. Fettfarbsfoffe (S. 157). Da aber auch Holz die Farbstoffe annimmt, so wird das Färbungsvermögen des Holzes durch Eau de Javelle zerstört (Mangin, Lit. S. 597, 5, Zimmermann, Lit. S. 597, 5), während die Färbkraft von Kork und Kutikula selbst nach 60stünd. Einwirkung der Lauge, zuweilen nach wochenlanger Wirkung (Kroemer) nicht abnimmt. Die Präparate werden mit Eau de Javelle eine Stunde oder länger mazeriert (die Suberinlamellen treten dann scharf hervor, legen sich öfters in kleine Falten, Kroemer), gut mit 1 % Salzsäure ausgewaschen und schließlich gefärbt. Die Färbung läßt sich auf dem Deckglase ausführen (bei zarten Objekten vorteilhaft). Die Farbstoffe, meist in 0.1—0.2 % Lösungen benutzt, werden teils in Alkohol-Glyzerin (zu gleichen Teilen, Sudan III, Alkannin, Cyanin), teils in Alkohol gelöst (Chlorophyllgrün, Scharlach R, Sudan III). In der Kälte vollzieht sich die volle Färbung in einigen Stunden, durch Erwärmen wird sie sehr beschleunigt. Ausgewaschen wird mit Glyzerin-Wasser (oder Wasser), untersucht in Glyzerin. Nur die mit Eau de Javelle behandelten Präparate liefern diagnostisch einwandfreie Färbungen[3]). Daher ist auf genügend lange Einwirkung der Lauge zu achten, die auch störende Gerb- und Farbstoffe (Phenole u. a.) entfernt.

Auch Anilinfarben können zur Färbung dienen. Tison[4]) benutzt konz. alkohol. Lösungen von Gentianaviolett, Dahlia, Methylgrün, die durch Ammoniakzusatz entfärbt sind, auch Mangins Pektinfarbstoffe,

[1]) C. van Wisselingh, S. la paroi d. cellules subéreuses, Arch. Néerl., 1888, XXII u.: S. la lamelle subéreuse et la subérine, Arch. Néerl., 1892, XXVI, S 305.

[2]) C. E. Correns, Anat. u. Entw. extranuptialer Nekatrien v. Dioscorea, Sitzb. Wien. Ak., 1888, XCVII, 1, 658.

[3]) Auch bei Doppelfärbungen (S. 553) werden Suberin- und Kutinmembranen gefärbt, gewöhnlich in nur wenig abweichender Farbe wie Holz, da ja bei Doppelfärbungen eine Vorbehandlung mit Eau de Javelle nicht stattfinden darf (um das Farbvermögen des Holzes nicht zu zerstören).

[4]) A. Tison, Méthode nouvelle de coloration des tissus subéreux, Compt. rend., 1899, S. 454.

Säuregrün und Pariser Violett, Bäsecke[1]) Anilinrot, Fuchsin, Malachitgrün, Pyoktanin, Naphthylenblau u. a. Auch hier erfolgt Vorbehandlung mit Eau de Javelle, dann Färbung (einige Min.), Auswaschen mit 5—10% Salz-, Salpeter- oder Schwefelsäure und Einlegen in Glyzerin.

Dimethylamidoazobenzol färbt in nicht mit Eau de Javelle behandelten Schnitten zunächst nur die Suberinlamellen gelb, nach einiger Zeit aber auch verholzte Membranen. Zusatz eines Tropfens verdünnter Salzsäure gestattet beide Lamellen sofort zu unterscheiden, da nur die verholzten Lamellen rot werden (M. Plaut, Veränd. im anat. Bau d. Wurzel während des Winters. Jahrb. wiss. Bot., 1910, XLVIII, S. 151).

Prodigiosin färbt Kork, Kutikula und Fette stark rot; die schwache Färbung, die andere Zellinhalte und verholzte Membranen annehmen, schwindet sofort beim Auswaschen mit Alkohol. Zu Doppelfärbungen dient alkohol. Malachitgrün. Prodigiosin, ein Bakterienfarbstoff, wird von Bact. prodigiosum (Bezugsquelle: Králs Labor., Prag) gewonnen, der sich auf Kartoffelscheiben in feuchter Kammer bei 25° in 3—4 Tagen in genügender Menge ziehen läßt. 5 g Bakterienmasse mit 30 ccm 95% Alkohol verrieben gibt filtriert das Reagens (ziegelrote Flüssigkeit), das sich vor Licht geschützt, einige Monate hält (O. Rosenberg, Verwend. v. Prodigiosin in d. bot. Mikrotechnik, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1898, XV, 56).

Die Natur der **Casparyschen Streifen** ist nicht ganz geklärt. Kroemer hält sie im Jugendstadium für verholzt. Im Sekundärzustand sind ihnen beiderseits Suberinlamellen angelagert. Rutheniumrot färbt die Streifen der Angiospermen, nicht die der Gymnospermen und Pteridophyten (Grund unbekannt)[2]). Zur besseren Sichtbarmachung der Streifen dient: Phloroglucinsalzsäure (rot), Chlorzinkjod (braun), Sudan (rötlich), Kalilauge (gelblich), ferner Chloralphenol, Methylgrünessigsäure, Anilinblau, Fuchsinjodgrün, Hämalaun[3]) und Dimethylamidoazobenzol (Plaut). Nach Vorbehandlung mit Eau de Javelle wird der Streifen durch Phloroglucinsalzsäure, Sudan, Chlorzinkjod u. a. nicht mehr gefärbt. Chromsäure und Schwefelsäure lösen.

Wachs.

Membranwachs, Wachsüberzüge werden mit de Bary (Wachsüberzüge d. Epid., Bot. Ztg., 1871, XXIX, 128) als Ausscheidungen der Kutikula angesprochen. Das gebildete Wachs ist zuerst in der Kutikula (niemals in den Zellen) nachweisbar und tritt aus dieser auf die Oberfläche. Wachsschichten,

---

[1]) P. Bäsecke, Phys. Scheiden d. Achsen u. Wedel der Filicinen, Ersatz des Korkes b. d. Pflanzengruppe, Bot. Ztg., 1908, LXVI, S. 26.

[2]) H. v. Alten, Wurzelstudien, Bot. Ztg., 1910, LXVIII_2, 153.

[3]) G. Rumpf, Rhizodermis, Hypodermis, Endodermis d. Farnwurzel, Diss. Marburg, 1904, Bibl. bot., 1904, Heft 62 u.: H. Müller, Metakutisierung d. Wurzelspitze u. verk. Scheid. d. Monokot.-Achsen, Bot. Ztg., 1906, LXIV, 53.

die nach dem Abwischen von neuem gebildet werden können (Rizinus, Rubus biflorus, Macleya cordata, nicht bei Sedum- u. Echeveria-Arten, Tittmann, Lit. S. 599 ob.), wachsen durch Intussuszeption. Die klebrige Substanz der Pollinien der Asclepiadaceen soll nach Dop (Compt. rend., 1902, CXXXV, 710) Wachs sein.

Wir unterscheiden 3 Typen der Wachsausscheidungen (de Bary): 1. Körnchenüberzug, Liliaceen, Gramineen, Cruciferen, Umbelliferen, Rosaceen u. a.); 2. Stäbchenüberzug (Sorghum, Saccharum, Musa, Strelitzia); 3. Krusten (Taxus, Euphorbien, Copernicia, Ceroxylon, Myrica u. a.). Wachsausscheidungen verringern die Transpirationsgröße, verhindern eine dauernde Benetzung, erschweren das Aufkriechen schädlicher Insekten; das epidermale Wachs der Myrica-Früchte dient wahrscheinlich als Anlockungsmittel für Tauben (Samenverbreitung). Die Wachsüberzüge der Blattunterseiten vieler Koniferen sollen nach Frimmel[1]) einen Lichtersparnisapparat bilden.



Fig. 135. Aloe (Blatt, Flächenansicht): durch absoluten Alkohol sind Anteile des Wachses herausgelöst, die unlöslichen Anteile bilden sphärokristallinische Massen (Tunmann).

Pflanzenwachse sind Verbindungen der Fettsäuren mit ein- oder zweiatomigen höheren Alkoholen.

Die epidermalen Wachse, seien es Körner, Stäbchen oder Schichten, sind im polarisierten Lichte stark doppelbrechend (Wiesner[2]). Die Präparation kann man sich bei verschiedenen Reaktionen durch Benutzung von Flächenschnitten erleichtern. Die Körnerschicht zeigt in Flächenansicht kleine Körnchen, die Stäbchenschicht feine, meist gekrümmte Stäbchen, die homogene Krustenschicht oft Quer- und Längsrisse, wodurch sie gefeldert erscheint (die Felder erstrecken sich über ganze Zellkomplexe). Um bei der Herstellung von Querschnitten die Stäbchenschicht nicht zu verletzen, muß man die Objekte freischneiden, oder sie nur auf einer Seite an Holundermark anlegen. Da Wachs von Wasser nicht benetzt wird, von dicht stehenden Stäbchen überdies Luft zurückgehalten wird, so beobachtet man in 70—90% Alkohol. Fügt man den Präparaten alkoholische Farbstofflösungen von Fuchsin, Sudan III, Alkannin zu, dann färben sich die Wachsausscheidungen. Allerdings findet zugleich eine Färbung der Kutikula statt, doch sind stets Farbendifferenzen wahrnehmbar. Beim Erhitzen der in Wasser

[1]) F. v. Frimmel, D. untere Kutikula d. Taxusblattes — ein Lichtreflektor, Östr. bot. Ztg., 1911, LXI, S. 216.

[2]) J. Wiesner, Beobachtungen über die Wachsüberzüge der Epidermis, Bot. Ztg., 1871, XXIX, S. 769 u.: Über die kristallinische Beschaffenheit der geformten Wachsüberzüge pflanzlicher Oberhäute, Bot. Ztg., 1876, XXXIV, 225.

liegenden Präparate schmilzt Wachs infolge seines niedrigen Schmelzpunktes zu Tropfen zusammen. In Schnitten, die mit Fettfarbstoffen (in 50 $^0/_0$ Alkohol) gefärbt sind, speichern die zusammenschmelzenden Wachstropfen die Farbstoffe. Verkorkte Membranen (Aloe verrucosa) und mächtige kutinisierte Schichten enthalten bisweilen Wachs eingelagert, so daß es nicht ohne weiteres sichtbar ist. Um es sichtbar zu machen, erwärmt man die Präparate unter Deckglas bis nahe zum Sieden, wodurch das Wachs in Tröpfchen heraustritt. Hierbei läßt sich (de Bary) zeigen, daß sich das Wachs an dem Aufbau der betreffenden Membranen beteiligt. Der Durchmesser der Membran wird gemessen. Alsdann werden die Präparate in Alkohol einige Zeit gekocht. Beim nachfolgenden Messen zeigen die Membranen eine Abnahme des Durchmessers, die durch das extrahierte Wachs bedingt ist.

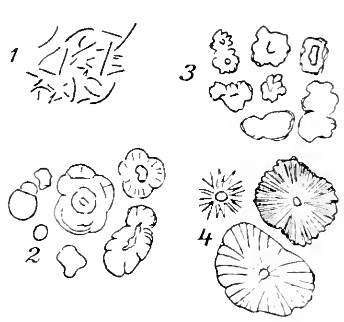


Fig. 136. Kristallformen im Mikrosublimat der Pflanzenwachse. *1* Copernica cerifera (Handelspulver, bei 150° erhalten), *2* Iris germanica, *3* Picea pungens glauca, *4* Copernica cerifera (Droge. Stücke, bei 200°) (Tunmann).

Die Membranwachse sind unter Deckglas im allgemeinen schwer löslich in Alkohol. Alkohol löst meist nur Anteile heraus, auch wenn größere Mengen zur Wirkung kommen (Fig. 135). Äther und Chloroform sind bessere Lösungsmittel. Orientierende Untersuchungen hatten folgende Ergebnisse: Sämtliche bis jetzt untersuchten Pflanzenwachse liefern kristallinische Sublimate (Tunmann, Nat. Vers. Karlsruhe 1911). Schabt man vorsichtig, ohne Membranteile abzuschneiden, eine Spur (wenige mg) des Reifes der Pflaume oder von dem Stengel von Foeniculum ab und sublimiert man dieselbe, so erhält man bereits deutliche Sublimate. Im allgemeinen besteht das erste Sublimat (etwa bei 150° erhalten) bei allen Wachsen aus isoliert liegenden Stäbchen, die oft gekrümmt sind. Bei höherer Temperatur erhaltene Sublimate führen Sphärokristalle oder Rosetten, die drusenförmig bei gekreuzten Nicols erscheinen, wobei übrigens alle Bildungen silbergrau aufleuchten (Fig. 136). Die Kristalle sind stets in Äther oder in Chloroform löslich, reagieren nicht mit Osmiumsäure, die des Wachses der Pflaume geben mit Chloroform-Schwefelsäure keine Rotfärbung (Phytosterine fehlen), sind in Kalilauge unlöslich, in Essigsäureanhydrid (kalt) schwer löslich, bei Erwärmen leicht löslich; sie lösen sich auch in Kalilauge-Ammoniak, doch ohne Myelinbildung. — Die Myelinbildung scheint nach den bisherigen Befunden zur Unterscheidung der Wachse von den Fetten geeignet zu

sein. Konz. Kalilauge-Ammoniak wirkt in der Kälte unter Deckglas nur wenig ein. Copernicia (Droge) zeigt innerhalb 24 Stunden keine Seifenbildung. Erst beim Erhitzen in der Lauge scheiden sich schaumige Tropfen ab, die bei gekreuzten Nicols stark aufleuchten und zum Teil sehr feine Nädelchen erkennen lassen. Die Wachse lassen sich weit schwerer verseifen als die Fette und diese Eigenschaft tritt beim Arbeiten am Objektträger noch schärfer als in der Chemie hervor. — Mit Kupferazetat konnte am Objektträger (auch beim Erhitzen) keine Reaktion erhalten werden.

Chitin.

Chitin (und sein Spaltungsprodukt Chitosan) ist ein höher zusammengesetztes, stickstoffhaltiges, am Stickstoff mit Azetylessigsäure verbundenes Polysaccharid. Reines Chitin zeigt keine Eiweißreaktionen, wird von verd. Säuren und alkoholischer Kalilauge angegriffen. Beim Erhitzen mit 50% Kalilauge auf 160—170° bildet sich Chitosan, daneben Essigsäure und Ammoniak. Chitosan enthält über 7% Stickstoff, ist löslich in verd. Salzsäure und verd. Essigsäure, fast unlöslich in verd. Schwefelsäure, gibt mit verd. Jodschwefelsäure Violettfärbung und entfärbt eine verd. Jodstärkelösung. Chitin, wahrscheinlich gibt es nur ein Chitin, kommt als hautbildende Substanz vielfach bei niederen Tieren (Insekten, Crustaceen, Mollusken) vor. In der Pilzmembran hatten Lassaigne, Payen (1843) u. a. bereits Stickstoff ermittelt und Gilson und Winterstein[1]) fanden in der Membran der Pilze Chitin. Ganz geklärt ist die Chitinfrage nicht. Die Annahme einiger Forscher, die jeden Zellulosegehalt in der Pilzmembran, auch in der jugendlichen, verneinen, erscheint noch fraglich. (Nach Ilkewitsch [Bull. Acad. Pétersb., 1908, 571] soll in der Pilzmembran weder Zellulose noch Chitin zugegen sein). Es ist nicht ausgeschlossen, daß Chitin in Bindung mit einem Kohlehydrat vorliegt. Diese Annahme würde verschiedene Widersprüche der mikrochemischen Befunde erklären. Auch sei erwähnt, daß vor kurzem C. Reuter (Z. Kenntn. d. stickstoffhalt. Bestandt. d. Pilze, Diss., Zürich, 1912, Ztschr. phys. Chem., 1912, LXXVIII) aus Boletus edulis und zwar aus dem, nach Behandeln mit Äther (Fett, Phytosterin), Alkohol (Trehalose, Zucker, Basen) und Wasser (Glykogen, Zucker, Basen) verbleibenden Rückstand neben 6% Chitin nach 10% amorphes Kohlehydrat erhielt.

Chitinmembranen werden vom Magensafte nicht verdaut; sie finden sich in den Faeces. Hierauf gründete J. Strasburger (Centralbl. f. Gynäkol., 1907) den Nachweis des Mutterkorns bei Abortus. Es scheint aber ein chitinlösendes Enzym zu geben, denn die Membranen der endotrophen Mykorrhizen (Peronosporeen) von Podocarpus, die nach K. Shibata (Cyt. Stud. endotroph. Mykorrhiz., Jahrb. wiss. Bot., 1902, XXXVII, 643) Chitin führen, werden verdaut.

[1]) Ausführl. Lit. bei: E. Winterstein, Ztschr. phys. Chem., XIX, S. 521, Zellner, Chemie der höheren Pilze, S. 123, D. H. Wester, Studien über das Chitin, Diss., Bern, 1909, Arch. d. Pharm., 1909, CCXLVII, S. 282.

Bereits den älteren Forschern war es aufgefallen, daß die Membranen der Pilze andere Reaktionen zeigen, als die Zellulosewände der höheren Pflanzen. Die Pilzmembran ist gegen Säuren und Alkalien sehr resistent, gibt mit Jodschwefelsäure oder mit Chlorzinkjod eine gelbe bis braune Färbung und ist unlöslich in Kupferoxydammoniak. de Bary[1]) bezeichnete den membranbildenden Stoff als Pilzzellulose, zumal nach längerer Einwirkung von verd. Kalilauge „Zellulosereaktionen" zu erzielen waren und Richter[2]) hat bei einer großen Anzahl von Pilzen nach langer Alkalibehandlung (einige Wochen) ebenfalls „Zellulosereaktionen" erhalten. Doch zeigte Gilson[3]), daß es sich um einen besonderen Membranstoff handelte (Mykosin), der sich mit Jodkaliumlösung, die eine Spur Säure enthält, rosaviolett färbt.

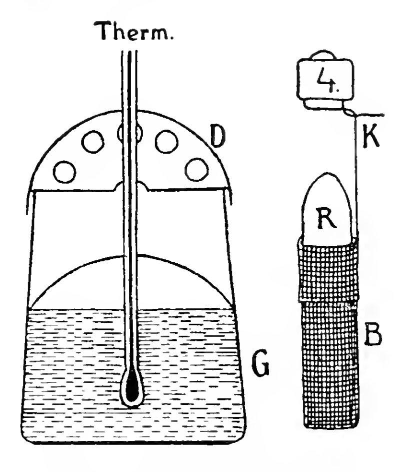


Fig. 137. Apparat zum Chitinnachweis nach van Wisselingh-Wester. Die Schnitte kommen mit der Lauge in das an beiden Enden zugeschmolzene Glasröhrchen (R); dieses, durch einen Kupferdrahtmantel (B) geschützt, wird mittels des gebogenen Kupferdrahtes (K) durch eine Öffnung des Deckels (D) in das Ölbad (G) eingehängt.

Nachdem nun das Auftreten von Chitin in den Pilzmembranen makrochemisch erwiesen ist, wissen wir, daß die nach der Alkalibehandlung zu erzielende vermeintliche Zellulosereaktion mit Jodschwefelsäure dem Chitosan zukommt, welches aus dem Chitin durch die Lauge gebildet wird. Hierauf hat van Wisselingh (Lit. S. 552 1) den mikrochemischen Nachweis gegründet. Die Präparate werden in 60 % Kalilauge in kleinen zugeschmolzenen und mit Kupfermäntel geschützten Glasröhrchen von 7 mm Durchmesser im Ölbade etwa 20 Minuten lang auf 160° erhitzt (Apparat Fig. 137). Nach dem Erkalten des Ölbades werden die Glasröhrchen geöffnet und die Präparate wiederholt mit Alkohol ausgewaschen, wodurch sie (durch Härtung) vor dem Zerfall bewahrt werden. Nun werden sie einige Stunden vorsichtig mit Wasser

[1]) A. de Bary, Morph. u. Biol. d. Pilze, 1884, S. 9.

[2]) K. Richter, Beitr. z. gen. Kenntn. d. chem. Beschaff. d. Zellmembran bei d. Pilzen, Sitzb. Wien. Ak., 1881, LXXXIII, 1, S. 494.

[3]) E. Gilson, Rech. sur la membrane cellulaire des champignons, La Cellule, 1894, XI, S. 5 und: De la présence de la chitine dans la membr. cell. des champignons, Compt. rend., 1895, CXX, S. 1000.

ausgewaschen, alsdann gelangen sie auf den Objektträger und unter Deckglas wird 0,5% Jodlösung durchsaugt. Nachfolgender Zusatz von 1% Schwefelsäure bedingt Violettfärbung. 3% Essigsäure, unter Deckglas zugesetzt, löst die Präparate mehr oder weniger völlig auf. Membranfarbstoffe, die die Violettfärbung der Jodschwefelsäure verdecken können, entfernt man zuvor mit verd. Chromsäure. Das Lichenin der Flechtenpilze, welches mit Jod ebenfalls blau wird, muß aus den Schnitten zuvor durch Erhitzen mit Glyzerin auf 300° (im zugeschmolzenen Rohr) entfernt werden. Mit der Zellulose teilt Chitin die Eigenschaft, sich beim Erhitzen in Glyzerin auf 300° nicht zu verändern. „Läßt eine Zellwand bei Erwärmung in Glyzerin keinen Überrest zurück, so ist dies ein Beweis, daß dieselbe kein Chitin und auch keine Zellulose enthält“ (van Wisselingh, l. c. S. 643).

Auch andere Jodreagentien reagieren mit Chitin, sind jedoch nicht so brauchbar wie die obenerwähnte schwache Jodschwefelsäure. „Nach Behandlung mit Jodjodkaliumlösung werden Chitinmembranen durch eine schwache Chlorzinklösung rötlichviolett gefärbt: Hinzufügung einer stärkeren Chlorzinklösung, z. B. eine, welche 40, 50 oder 60% Chlorzink enthält. bewirkt eine blauviolette oder blaue Verfärbung, eine noch stärkere (70%) Entfärbung“ (van Wisselingh). Und Benecke[1]) zeigte, daß Chitin mit konz. Chlorzinkjod behandelt, sich bei nachfolgendem Zusatz von größeren Wassermengen violett färbt.

Die Ölbadmethode erscheint auf den ersten Blick umständlich. Sie ist aber recht einfach, wenn man sich erst mit der nötigen Apparatur versehen hat und verlangt nur ein vorsichtiges Umgehen der mit der Lauge behandelten Präparate. Die Färbungen der Chitosanreaktion fallen selbst an dem gleichen Präparate verschieden aus (von Schwarz-, Rot- bis Braunviolett). Es erscheint aber fraglich, ob man hierfür mit Kindermann[2]) einen verschieden hohen Chitingehalt verantwortlich machen kann, zumal viel von der Dauer der Laugenbehandlung und von dem Material abhängt. Bei sehr vielen Pilzen wurde die Chitosanreaktion von van Wisselingh ausgeführt und von Wester an vielen tierischen und pflanzlichen Objekten.

Bei den höheren Pilzen kommt fast ausschließlich Chitin vor. Es ist beachtenswert, daß die normalen Hyphen von Polyporus officinalis (Agaricus-Droge) Chitin führen, aber nicht die Membranreste der Harzhyphen (Tunmann, Lit. S. 152, 2). Unter den Myxomyceten hat sich bisher nur Plasmodiophora brassicae als chitinhaltig erwiesen

[1]) W. Benecke, Bot. Ztg., 1905, LXIII, S. 227.

[2]) Kindermann, Die Fruchtkörper von Stereum sanguinolentum, Öst. bot. Ztschr., 1901, LI, S. 32.

(van Wisselingh). Auch Jahn[1]) fand bei Comatricha und Stemonitis kein Chitin. Bei den Saprolegnieen und Peronosporeen (s. auch S. 556) fehlt Chitin; es wird durch Zellulose vertreten. Schon Pringsheim fand, daß sich die Membranen von Apodya und Achlya in Kupferoxydammoniak lösen und von Chlorzinkjod blau gefärbt werden (Lit. S. 517, 3). Die abweichenden Angaben, die über den Chitingehalt der Flechtenpilze vorliegen (Escombe, Müller, Kohl, van Wisselingh), sind vielleicht in einem schwankenden Chitingehalt begründet. Für die Mucorineen gibt van Wisselingh Chitin an, Mangin (Journ. Bot., 1899, XIII, 209) hingegen Zellulose, Callose und Pektin, doch soll die Mucorineenzellulose widerstandsfähiger als die Zellulose der Phanerogamen sein. Die vegetativen Hyphen führen (Mangin) innen Zellulose, außen Pektinsubstanzen in der Membran, die Sporangien haben außerdem Callose und die Zellulose führt fast immer Kalkablagerungen. Werden endogene Sporen mit Kalilauge und Salzsäure behandelt, dann zeigen sie Callosereaktion. An den Zygosporen sind nach Vuillemin[2]) durch Jodschwefelsäure und durch Hämatoxylin deutlich fünf Schichten zu unterscheiden.

Emmerling, Ruppel und Iwanoff traten auf Grund makrochemischer Befunde für einen Chitingehalt der Bakterienmembran ein. Hingegen fanden kein Chitin van Wisselingh in Bacillus megaterium, anthracoides, mesentericus, fluorescens, violaceus, pulcher, Grabowski[3]) in B. luteus, tumescens, asterosporus, Wester in Staphylococcus aureus und Colibakterien, Tunmann (Lit. S. 94, 2) in B. caucasicus (Kefir). Jedoch hat Viehoever[4]) bei B. probatus einwandfrei Chitin nachweisen können. Der negative Befund anderer Autoren scheint an der Benutzung einer zu schwachen Vergrößerung zu liegen. Es muß „mindestens eine 2000fache Vergrößerung“ zur Erkennung der Violettfärbung benutzt werden. Zur Untersuchung sind ausgereifte Sporen zu nehmen, die am widerstandsfähigsten und wohl auch am reichsten an Chitin sind.

Die Membranen von Beggiatoa mirabilis Cohn (auch die Querwände) reagieren nicht auf Zellulose oder Chitin. In konz. Kalilauge auf 160° erwärmt, reagieren sie nicht mit Jod. Hingegen werden sie von Rutheniumrot, Safranin und Methylenblau gefärbt (Pektinsub-

[1]) E. Jahn, Zur Kenntnis des Schleimpilzes Comatricha obtusata, Schwendener Festschr., 1899, S. 288.

[2]) P. Vuillemin, Recherch. morph. etc. sur l. membr. d. Zygosp., Ann. myc., 1904, II, S. 483.

[3]) L. Grabowski, Dissertation, Marburg 1907, nach A. Meyer, Die Zelle der Bakterien, Jena 1912, S. 177.

[4]) A. Viehoever, Über den Nachweis von Chitin bei Bakterien, Ber. deutsch. bot. Ges., 1912, XXX, S. 443.

stanzen, Hinze, Lit. S. 68, 7 u. Ber. bot. Ges., 1903, XXI, S. 309.) Ähnlich verhält sich die Wand von Thiophysa volutans.

Für die Cyanophyceen gibt Hegler (Lit. S. 515, 1) Chitin an, Kohl (Lit. S. 515, 1) Chitin und Zellulose. van Wisselingh und Wester fanden weder Chitin noch Zellulose.

Nach Wittlin (Lit. S. 490, 3) sollen der Pilzzellulose (also dem Chitin) nahestehen die Raphidenhüllen; sie reagieren nicht mit Jodschwefelsäure und sind durch eine Pektinsubstanz untereinander verkittet, die sich in Kaliumchlorat-Salpetersäure löst. Das Auftreten von Pilzzellulose in Phanerogamen erscheint fraglich.

Bemerkungen über die Membran der Kryptogamen.

Die Ansichten über die Natur der Membranen der niederen Pflanzen stimmen in den meisten Fällen wenig überein. — Bei den **Myxomyceten** sollen die Sporangienwände und die Capillitiumfasern im jugendlichen Zustande Zellulose führen (Trichia, Lycogala, Arcyria, de Bary, Lit. S. 140, 5. Stemonitis, Comatricha, Jahn, Lit. S. 609, 1). Sie verändern sich später. Holz und Chitin ist nicht nachweisbar. Für Didymium gibt van Wisselingh (Lit. S. 552, 1) Zellulose an. — **Bakterien** führen Chitin (S. 609). — Der Chitingehalt der **Cyanophyceen** ist fraglich. — **Diatomeen:** Der nach der Entfernung der Kieselsäure mit Fluorwasserstoffsäure (S. 106) zurückbleibende Anteil der Diatomeenmembran reagiert nicht auf Zellulose. Er besteht wahrscheinlich aus Pektinsubstanzen[1]). Vor der Pektinreaktion muß die Kieselsäure entfernt werden durch 24stündiges Behandeln mit 50% Salzsäure und chlorsaurem Kali. Der Rückstand wird (Zentrifugieren) gewaschen mit: 1. absol. Alkohol, 2. einer sirupdicken Lösung von Kalium in Alkohol, 3. Weingeist, 4. absol. Alkohol, alsdann kommt er in 3% Borsäure und wird mit Rutheniumrot gefärbt. Zum Studium werden die Zellinhalte mit Eau de Javelle und Alkohol entfernt, dann wird mit alkohol. Methylviolett gefärbt, schließlich Nelkenöl, Balsam oder Styrax[2]). — **Peridineen** sollen Zellulose führen. Die Zellulosereaktion tritt (Membranleisten) erst nach Vorbehandlung mit Kalilauge oder Säuren ein (Lit. S. 441, 4). Auch Klebs (Lit. S. 552, 2) gibt für die Membran gallertbildender Algen, die mit Kongorot, konz. Jodjodkalium, Chlorzinkjod und Jodschwefelsäure reagiert, Zellulose und eine „chemisch noch unbekannte" Substanz (Hemizellulose?) an, die sich

[1]) L. Mangin, Observations sur les Diatomées, Ann. sc. nat. bot. 1908, sér. IX, VIII, S. 177.

[2]) W. Benecke, Farblose Diatomeen d. Kieler Förde, Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, XXXV, S. 535.

mit verd. Salzsäure ausziehen läßt. — **Desmidiaceen**membran kann mit Fuchsin, Methylviolett und Bismarckbraun gefärbt werden bei Nachbehandlung mit Kaliumazetat. Die Färbungen werden an den durch Druck von den Protoplasten befreiten Zellen (lebendes Material) vorgenommen (Lütkemüller, Lit. S. 587, 2). — Die Membran der **Derbesien** besteht aus 2 Substanzen, die sich durch konz. Schwefelsäure voneinander unterscheiden lassen und besonders deutlich bei nachfolgendem Zusatz von Chlorzinkjod hervortreten (Lit. S. 482, 2). Die Wände von **Haematococcus** sollen keine Zellulose führen. Die Zellulosereaktion mit Jodschwefelsäure soll durch gelöste Stärke vorgetäuscht werden (Wollenweber, Lit. S. 482). Auch den **Siphoneen** und **Characeen** soll ein eigener Membranstoff zukommen[1]. Nur die jüngsten Sproßspitzen geben einwandfreie Zellulosereaktionen. Ältere Membranen reagieren weder auf Zellulose noch auf Pektin. Holz und Kork fehlt. Chlorzinkjod und Jodschwefelsäure färben braun bis rotbraun, Kongorot färbt nicht. Färbungen geben Safranin, Gentianaviolett, Crocein, Methylenblau (nicht mit Säurealkohol auswaschbar) und Jodgrün (leicht auswaschbar). — Auch die Membransubstanz von **Caulerpa** ist unbekannter Natur; sie löst sich nicht in Kupferoxydammoniak und in 12% Natronlauge. Alle Caulerpa- und einige Bryopsis-Arten geben mit konz. Schwefelsäure bei nachfolgendem Auswaschen mit Wasser Sphärite. Diese sind doppelbrechend, nehmen 100—300% Wasser auf, werden mit Jod gelbbraun und zwar von Jodschwefelsäure gleichzeitig gelöst, von Chlorzinkjod verquollen. Sie lösen sich in 12% Natronlauge, konz. Essigsäure und Kupferoxydammoniak, sind aber unlöslich in Eau de Javelle[2]. — Hingegen kommt in **Phaeophyceen** Zellulose vor. Außerdem findet sich in Fucus vesicul. und Sphaeroc. crisp. ein Kohlehydrat, Fucin, das sich bei 300° in Wasser löst und sich mit Jodkalium und 1% Schwefelsäure blau färbt. Es kommt vorzüglich in der Mittellamelle vor. Setzt man einem mit 1% Jodschwefelsäure gefärbten Schnitt (der Blaufärbung in der Mittellamelle zeigt) 76% Schwefelsäure zu, dann wird die Färbung umgekehrt, die fucinhaltige Mittellamelle wird farblos, die Zelluloselamelle blau. — **Corallineen** färbt K. Yendo (Ztschr. wiss. Mikr., 1904, XXI, 260) nach Entkalkung mit Hämatoxylin-Fuchsin. Die Genicula-Membran besteht aus Gelose und Zellulose, erstere muß vor der Zellulosereaktion entfernt werden. — Die Membranen der höheren **Pilze** führen Chitin (S. 606), Callose (S. 556) und wohl noch weitere unbekannte Polysac-

[1] B. Dębski, Weit. Beobachtungen an Chara fragilis Desv., Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXII, S. 635.

[2] C. Correns, Membr. v. Caulerpa, Ber. bot. Ges., 1884, XII, S. 355.

charide. Die Capillitiumfasern einiger Bovistaarten werden mit Phloroglucinsalzsäure rot. Die reagierende Substanz hält Harz[1]) für Lignin. doch soll sie sich in Kalilauge und in Natronlauge langsam lösen. — Die Wände der **Moose** bestehen teils aus Zellulose und Pektinen. teils aus Ester dieser Körper mit Dicranumgerbsäure und Sphagnol. Holz fehlt, denn auch die mechanischen Elemente geben nach Vorbehandlung mit warmer Kalilauge Zellulosereaktion. Die Membranen des Protonema und der meisten Lebermoose reagieren ohne weiteres mit Jod auf Zellulose[2]). Die Wände der Laubmoose werden mit Kalilauge gelb, mit Eisenchlorid blau- bis grünschwarz[3]). Der, die Eisenreaktion gebende Körper, Dicranumgerbsäure, kann durch stark verd. Alkalien, aber nicht durch kochendes Wasser entfernt werden und liegt jedenfalls in esterartiger Bindung vor (Leucobryum, Gottschea, Mastigobryum). Viele Moosmembranen (Sphagnum, Fontinalis. Trichocolea, Hypnaceen) werden durch Eisenchlorid rotbraun, durch Millon kirschrot. Den, diese Reaktionen gebenden Körper nannte Czapek[4]) Sphagnol, er löst sich in Alkalien, ist stickstofffrei und kristallisiert. Auch dieser Stoff muß in esterartiger Bindung vorliegen. denn nach Vorbehandlung mit Schultzeschem Gemisch, verd. Chromsäure oder nach Kochen mit verd. Alkalien erhält man typische Zellulosereaktionen. Sphagnol und Dicranumgerbsäure können sich gegenseitig vertreten oder gleichzeitig vorkommen. Mit Rutheniumrot hat Gjokić verschiedentlich (Sphagnum) Pektinreaktion erhalten und auch Czapek fand Pektine, die sich mit starker Natronlauge ausziehen lassen. Die bei Gelegenheit anderer Untersuchungen vorgenommenen Beobachtungen der Literatur bestätigen die Abwesenheit von Holz und die Anwesenheit von Zellulosen und Substanzen, die mit Alkalien ausziehbar sind. So lösen sich die gelbbraunen Membranen der Brutkörper von Georgia pellucida langsam in konz. Schwefelsäure und werden mit Osmium geschwärzt und mit Chlorzinkjod goldbraun. Nach Vorbehandlung mit Eau de Javelle schwärzt Osmium nicht mehr und Chlorzinkjod färbt violett[5]). — Bei den **Gefäßkryptogamen** nähert sich der chemische Aufbau der Membran dem der höheren Pflanzen. Die Ligninreaktion mit Phloroglucinsalzsäure tritt bei Equisetum (mechanische Elemente) und Salvinia

[1]) O. Harz, Lignin in Pilzmembr., Bot. Centralbl., 1886, XXV, S. 386.
[2]) G. Gjokić, Chem. Beschaffenh. d. Zellhäute b. d. Moosen, Öst. bot. Ztschr., 1895, XLV, S. 330.
[3]) Ruge, Organe der Lebermoose, Flora, 1893, S. 301.
[4]) F. Czapek, Zur Chemie der Zellmembranen bei den Laub- und Lebermoosen, Flora, 1899, LXXXVI, S. 361.
[5]) C. Correns, Über d. Brutkörper d. Georgia pellucida u. der Laubmoose, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XIII, S. 420.

(Tracheiden) nicht, oder doch nur schwach (Salvinia), ein; starke Reaktionen geben Sklerenchym, Parenchym, zuweilen Mesophyll der Farne und die Mesophyllzellen einiger Lycopodiaceen[1]. Pektine treten reichlich auf, und zwar nicht nur in der Mittellamelle und in den Auskleidungen (Mangin, Lit. S. 565, 4), sondern auch in Trichomen (Tunmann, Lit. S. 94, 2). Der Hauptbestandteil der Membran ist Zellulose. Die Zellulosereaktionen habe ich an nicht stark braun gefärbten Wänden (Adiantum) mit Jodschwefelsäure direkt erhalten bei längerer Einwirkung einer völlig konz. Säure. Vielfach wird man jedoch den braunen, „Gerbstoffreaktionen" gebenden Körper (Vagin, A. Meyer) vor der Jodreaktion durch kurze Behandlung mit Eau de Javelle entfernen müssen. Die nähere Natur des Vagins ist nicht bekannt. Alkoholische und wässerige Kalilauge verändern den Körper selbst beim Kochen nicht, auch treten keine Seifenmassen aus. Werden die Schnitte nacheinander mit alkoholischer 20% Kalilauge, Eau de Javelle und heißem Wasser behandelt, dann zeigt sich, daß „der durch Kalilauge nicht herausgelaugte Farbstoff sich nach der Einwirkung von Eau de Javelle in hellgelblichen Tropfen von teilweise kristallinischer Struktur auf der Membran und in den Zellen ausgeschieden hatte" (Bäsecke, Lit. S. 603, 1). Diesen oder doch einen nahestehenden Körper führen auch die braunen Wände verschiedener Farntrichome (Cibotium-Arten u. a., Pennewar Djambi), welche bei der Mikrosublimation Kristalle geben, die unter Deckglas in Kalilauge unlöslich sind (Lit. S. 94, 2).

[1] K. Linsbauer, Zur Verbreitung d. Lignins bei Gefäßkryptogamen, Öst. bot. Ztschr., 1899, XLIX, S. 317; auch: Thomae (Jahrb. f. wiss. Bot., 1886, XVII, 99) u. a.

Register*).

*) Es ist in erster Linie auf die chemischen Körper verwiesen. Namen von Pflanzen und Pflanzenfamilien sind nur genannt, wenn bestimmte mikrochemische Angaben vorliegen. Bei allgemein gebrauchten Reagentien (für Alkaloide, Glykoside, Lösungs- und Fixierflüssigkeiten, Farbstoffen) findet sich nur ein Hinweis auf Herstellung und Zusammensetzung. — N. = Nachweis, z. N. v. = zum Nachweis von, Zus. = Zusammensetzung des Reagens.

B

C

(siehe auch K)

I u. J

K

(s. auch C)

N

Q

R

S

T







